

Unterschiedliche zelluläre Sortierung

zweier viraler K⁺-Kanäle:

Die Bedeutung der zweiten Transmembrandomäne als Sortierungssignal

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation von

Dipl. Biol. Jörg Balß

aus Darmstadt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel
Mitberichterstatter: PD Dr. Ulrike Homann

Tag der Einreichung: 14. November 2007
Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2007

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die im Laufe der Jahre ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Bereitstellung eines sehr interessanten Themas, das mich über die ganze Zeit gefesselt hat; für die vielen wichtigen Diskussionen und Hilfen, die meine Arbeit in die richtigen Bahnen gelenkt haben, und besonders für den sehr angenehmen und lockeren Umgang, der maßgeblich meine Motivation und damit die Entwicklung meiner Arbeit gefördert hat.

Frau PD Dr. Ulrike Homann für die Übernahme des Koreferats und für ihre hilfreichen Erklärungen zur Welt der Elektrophysiologie.

Allen verflossenen und aktuellen Mitarbeitern der AG Thiel, die ich über die Jahre kennengelernt habe, die jederzeit hilfsbereit im Labor zur Seite standen und mit deren Hilfe fachliche Probleme gelöst werden konnten, mit denen aber auch jederzeit lustige Unterhaltungen, nette abendliche Glücksspielrunden, spontane Grillpartys oder auch mal ein „Feierabend-Bierchen“ möglich waren.

Mein besonderer Dank gilt:

Andi für die gewonnen Erkenntnisse während seines F-Praktikums und der Diplomarbeit.

Dirk für die stetig aktuellen Informationen zur Welt des Fußballs und die Hilfe bei der Durchführung der Hefeexperimente.

Melanie, unserem lebenden Paper-Archiv, die mich häufig mit neuem interessantem Wissen eindeckte.

Mario, der durch seine Arbeit den Grundstock zu meiner Dissertation legte und mir jederzeit Rede und Antwort stand.

Jenny für die tolle Zeit während unseres Thailand-Urlaubs, der mit vielen Leckereien und einigen *buckets* gekrönt wurde.

Brigitte, bei der ich mit einem Forschungspraktikum meinen Einstand in der AG Thiel hatte, auf das auch eine von ihr betreute Diplomarbeit folgte. Während der ganzen Zeit wurde sie nie müde, mir auf meine Fragen Antworten zu geben; durch unsere häufigen Diskussionen und das Korrekturlesen hat sie mir wichtige Impulse für meine Arbeit gegeben.

Meiner Schwester Elisabeth für ihr geduldiges und kompetentes Korrekturlesen.

Meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums ideell und finanziell unterstützt haben, danke ich für ihre Geduld und das Vertrauen, mit dem sie mich meinen Weg gehen ließen.

Ganz besonders danken möchte ich **meiner Freundin Doreen**, die durch ihren Glauben an mich, ihre liebevolle Unterstützung und ihrer Hilfe bei Formulierungsfragen sehr zur erfolgreichen Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Viren als Werkzeug der Zell- und Strukturbiologie	1
1.1.1 Viren als Helfer bei der Aufklärung zellbiologischer Abläufe.....	1
1.1.2 Viren als Quelle von Proteinen mit Minimalstrukturen.....	2
1.2 Intrazellulärer Transport und Sortierung von Proteinen in Eukaryonten	5
1.2.1 Signalsequenzen.....	7
1.2.2 Insertion von Membranproteinen.....	7
1.2.3 Besonderheiten des Proteintransports – Duales <i>targeting</i>	11
1.3 Aufgabenstellung der Arbeit.....	14
2 Ergebnisse.....	16
2.1 Vorangegangene Untersuchungen	16
2.2 Vergleich der Primär- und Sekundärstruktur von Kcv und Kesv	16
2.3 Vorhersagen von Signalsequenzen und der wahrscheinlichen Lokalisation von Kcv und Kesv	20
2.4 Lokalisationsstudien Kcv und Kesv	23
2.5 Kesv::GFP ist fest mit den Mitochondrien assoziiert	26
2.6 Der N-Terminus von Kesv enthält ein Mitochondrien-Signal.....	27
2.7 Einfluss der zweiten Transmembrandomäne auf die Lokalisation	34
2.8 Verlängerung der TM2 mit anderen und einer unterschiedlichen Anzahl von Aminosäuren.....	37
2.9 Ist die Position der Insertion in der TM2 entscheidend	38
2.10 Vergleich der vorhergesagten TM2 zwischen Kcv und Kesv	41
2.11 Ist die zweite Transmembrandomäne entscheidend für die unterschiedliche Sortierung?.....	43
2.12 Chimären mit einer veränderten ersten Transmembrandomäne zeigen ein unterschiedliches <i>targeting</i>	46
2.13 Untersuchungen zum Kesv-Transportweg in die Mitochondrien.....	50
2.14 Hefekomplementationstest von Kesv, Kcv, Chimären und Mutanten.....	52
3 Diskussion.....	55
3.1 Kesv::GFP ist in den Mitochondrien lokalisiert	56

3.2	Kesv trägt mindestens zwei Signale für die mitochondriale Lokalisation.....	58
3.3	Funktionalität der Mutanten und Chimären mit verändertem <i>targeting</i>	63
3.4	Physiologische Bedeutung von Kesv.....	66
3.5	Resümee und Ausblick	67
4	Zusammenfassung	69
5	Material und Methoden.....	71
5.1	Chemikalien und Fluoreszenzfarbstoffe	71
5.2	Sterilität.....	71
5.3	Molekularbiologische Methoden	71
5.3.1	Enzyme	71
5.3.2	Größenstandards	71
5.3.3	Reaktionssysteme.....	72
5.3.4	Oligonukleotide	72
5.3.5	Plasmide.....	72
5.3.6	Konstrukte.....	75
5.3.7	Heterologe Expressionssysteme	75
5.3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	76
5.3.9	Ligation.....	80
5.3.10	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	80
5.3.11	Hitzeschocktransformation	81
5.3.12	Plasmidpräparation	81
5.3.13	DNA-Quantifizierung	81
5.3.14	DNA Sequenzierung.....	81
5.3.15	Gelelektrophorese	82
5.3.16	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	82
5.3.17	Transfektion von CHO-K1- und HEK293-Zellen	82
5.4	Proteinbiochemische Methoden.....	83
5.4.1	Antikörper.....	83
5.4.2	Immunolokalisation	83
5.4.3	Brefeldin A- Assay	83
5.4.4	Isolierung von Mitochondrien aus HEK293-Zellen	84
5.5	Hefekomplementationstests	84
5.6	Lösungen und Medien für Hefekomplementation	84

5.6.1	Kultivierung von Hefezellen.....	87
5.7	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).....	89
5.8	Software und Internetadressen.....	89
5.9	Genbanknummern.....	90
6	Literaturverzeichnis	91
Anhang	IV
A	Abkürzungen.....	IV
B	Aminosäuren, Ein- und Dreibuchstabencode	V
C	Konstrukte.....	V
D	Primer.....	VII

1 Einleitung

1.1 Viren als Werkzeug der Zell- und Strukturbiologie

Viren befallen Zellen höherer Organismen und verändern deren Struktur und zelluläre Prozesse. Dies dient alleinig ihrer Replikation, zu der sie ohne den Wirt nicht fähig wären, da sie aufgrund ihrer geringen Größe nur über eine sehr begrenzte genomische Ausstattung verfügen und so nicht alle benötigten Proteine zu ihrer Vervielfältigung besitzen. Zur Übernahme der Zellen verwenden Viren verschiedene Wege. Diese haben sie während der Jahrmillionen ihrer Koevolution mit dem Wirt perfektioniert und können so die zelluläre Maschinerie nach ihren Zwecken nutzen und kontrollieren. Sie benötigen beinahe in jeder Stufe ihres Infektionszykluses diese Maschinerie. Dabei übernehmen die Viren zum Beispiel Teile des Transkriptions-, Translationsapparates und auch der Proteinsortierung und nutzen diese für ihre Replikation. Durch Untersuchungen der Zell-Virus-Interaktionen ist es möglich etwas über die Physiologie des Virus zu erlernen, sowie über noch unbekannte Abläufe in der Wirtszelle. Durch genauere Beobachtungen der Veränderungen, die durch einen Virenbefall verursacht werden, konnten deshalb schon mehrfach neue Erkenntnisse hinsichtlich zelleigener Abläufe erbracht werden, die sonst nur schwer zu entdecken gewesen wären, wie im folgenden Abschnitt anhand einiger Beispiele verdeutlicht werden soll. Diese Erkenntnisse machen Viren und die jeweiligen Wirte zu interessanten Untersuchungsobjekten und geradezu hervorragenden Modellsystemen. Somit können Viren als ein sehr gutes Werkzeug der Zellbiologie bezeichnet werden.

1.1.1 Viren als Helfer bei der Aufklärung zellbiologischer Abläufe

Es ist das Ziel von Viren sich replizieren zu lassen, indem sie ihr Genom in die Wirtszelle einschleusen. Viele Viren machen sich dabei die Endocytose der Zellen zu nutze. Sie verwenden eine Vielzahl unterschiedlicher Wege, die zuvor noch nicht bekannt waren und erst durch die Untersuchung der Zell-Virus-Wechselwirkungen aufgeklärt werden konnten. So konnte gezeigt werden, dass neben dem klassischen Clathrin-gesteuerten Weg Viren auch über Caveolae- und *lipid raft*-vermittelte Endocytosewege in die Zelle aufgenommen werden können. Diese frühen Infektionsprozesse genauer zu untersuchen, scheint ein guter Ansatzpunkt zu sein, um nicht nur mehr über Infektionswege und dadurch über Behandlungsansätze zu erfahren, sondern auch weitere ungelöste zellbiologische Fragen aufzuklären (Pelkmans und

Helenius, 2003; Söllner *et al.*, 2004).

Den Untersuchungen eines humanpathogenen Virusinfektionsprozesses verdankt man die Entdeckung eines ER-Exportmotives, welches zuerst im *vesicular stomatitis virus glycoprotein* (VSV-G), einem Membranprotein, gefunden wurde. Bei diesem Motiv handelt es sich um ein diazides Motiv, das aus den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat unterbrochen von einer beliebigen Aminosäure besteht (Nishimura und Balch, 1997). Durch Mutation dieses Sequenzmotivs wird nur noch etwa ein Zehntel der normalen Plasmamembranexpression von VSV-G erzielt (Sevier *et al.*, 2000). Auch in einem weiteren viralen Protein, dem Hämagglutinin aus dem *Influenza* Erreger, konnte ein diazides ER-Exportmotiv nachgewiesen werden. Die Entdeckung dieses Sequenzmotivs bei zwei viralen Proteinen führte dazu, dass Signale auch in eukaryontischen Proteinen gefunden und charakterisiert werden konnten (Ma *et al.*, 2001; Barlowe, 2003).

1.1.2 Viren als Quelle von Proteinen mit Minimalstrukturen

Nicht nur zellbiologische Probleme können mithilfe von Viren gelöst werden, sondern Viren können auch einen Beitrag zur Aufklärung von Struktur- und Funktionsbeziehungen komplexerer Proteine leisten. Von Nutzen ist dabei, dass viele Proteine, die vom viralen Genom kodiert werden, von geringer Größe sind und so womöglich die kleinste katalytische Einheit bilden, aber dennoch wie komplexere Proteine der gleichen Proteinklasse funktional sind (Kang *et al.*, 2003). Hierfür können einige Beispiele genannt werden, die bis auf das letzte Beispiel sämtlich aus dem *Paramecium bursaria chlorella Virus* (PBCV-1) stammen:

- (1) Die kleinste bekannte eukaryontische ATP-abhängige DNA-Ligase (Ho *et al.*, 1997), die Gegenstand von intensiven mechanistischen und strukturellen Untersuchungen ist (Sriskanda and Shuman, 2002),
- (2) die kleinste bekannte Typ II DNA-Topoisomerase, die doppelsträngige DNA etwa dreißig mal schneller schneidet als die menschliche Variante (Lavrukhi *et al.*, 2000; Fortune *et al.*, 2001; Fortune *et al.*, 2002),
- (3) das kleinste Enzym (120 AS), das post-translational Chromatin verändern kann (Manzur *et al.*, 2003),
- (4) eine RNA-*capping*-Guanylyltransferase, die als erste ihres Typs kristallisiert werden konnte (Ho *et al.*, 1996; Doherty *et al.*, 1997),
- (5) der kleinste bisher bekannte Kaliumkanal Kcv (Kaliumkanal *Chlorella Virus*) mit einer Größe von lediglich 94 AS. (Plugge *et al.*, 2000; Gazzarrini *et al.*, 2003),

- (6) ein weiterer Kaliumkanal Kev (Kaliumkanal *Ectocarpus siliculosus Virus*), der mit 124 AS etwas größer ist als Kcv (Mehmel, 2004; Chen *et al.*, 2005).

Die beiden letzten Beispiele sollen hier näher ausgeführt werden. Dazu werden kurz Kaliumkanäle im Allgemeinen und dann die viralen Kaliumkanäle Kev, der Hauptuntersuchungsobjekt dieser Arbeit war, und Kcv, der in dieser Arbeit als Vergleichsprotein herangezogen wurde, im Speziellen vorgestellt.

Allgemeine Eigenschaften von Kaliumkanälen treffen auf die verschiedenen Varianten in Pro- und Eukaryonten zu: Alle Kaliumkanäle liegen als Di- oder Tetramere vor, dass heißt die vier poren-bildenden Proteinbereiche sind symmetrisch um eine wassergefüllte Pore angeordnet (MacKinnon *et al.*, 2001). Jede Untereinheit dieses Tetramers besitzt Transmembrandomänen, deren Anzahl je nach Typ des Kanals zwischen zwei und acht Transmembranhelices variieren kann (Miller, 2000).

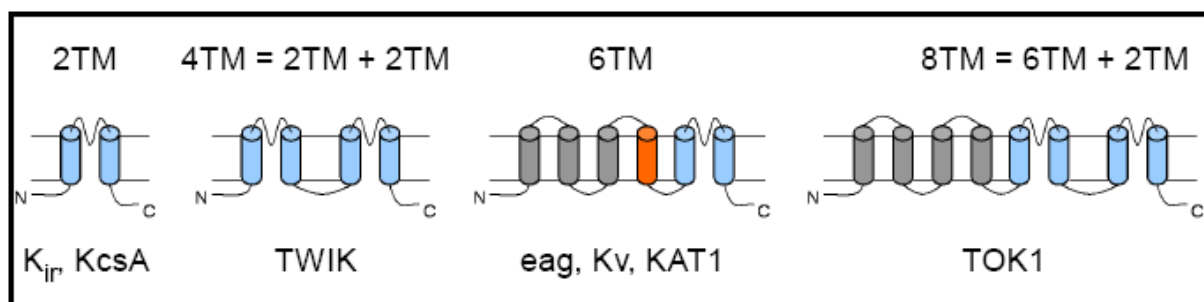


Abbildung 1: Kaliumkanal-Grundstrukturen; sie unterscheiden sich in der Anzahl ihrer Transmembran- (grau) und Porendomänen (blau) voneinander. 6TM-Kanäle können einen Spannungssensor (orange) besitzen.

In Abbildung 1 sind die wichtigsten Kaliumkanalbaupläne aufgeführt. Der einfachste Aufbau einer Untereinheit besteht aus zwei Transmembranhelices (2 TM), die durch eine Porendomäne miteinander verbunden sind. Zu diesem Typus gehören die eukaryontischen *K_{ir}*-Kanäle (Kubo *et al.*, 1992) und *KcsA*, ein Kaliumkanal aus dem Bakterium *Streptomyces lividans* (Doyle *et al.*, 1998). Weit verbreitet sind auch die 6 TM-Kanäle, zu denen die Kv-Kanäle (Shih & Goldin, 1997), die *eag*-Kanäle (Kubo *et al.*, 1992) und die pflanzlichen Kaliumkanäle KAT1 (Anderson *et al.*, 1992) und AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992) gehören. Des Weiteren gibt es auch 2 TM + 2 TM-Kanäle (Tandemkanäle), die zwei Porendomänen besitzen; in diesem Fall wird ein funktioneller Kanal nur von zwei Untereinheiten gebildet. Dies trifft zum Beispiel auf die humanen TWIK-Kanäle zu (Lesage *et al.*, 1996). Als weiteres Beispiel hierfür

sei TOK1 (8 TM) aus der Hefe genannt, der über vier zusätzliche Transmembranhelices verfügt (Ketchum *et al.*, 1995). Allen Kaliumkanälen sind einige grundlegende Strukturelemente gemeinsam, die höchst konserviert sind. Dazu gehören zwei Transmembrandomänen, welche durch die Porenregion miteinander verbunden sind. Die Porendomäne besteht aus einer linearen Aminosäuresequenz (TXXTXGY/FG), die als Selektivitätsfilter wirkt (Doyle *et al.*, 1998).

Der in dieser Arbeit als Vergleichsprotein verwendete Kaliumkanal Kcv (Kaliumkanal *Chlorella Virus*) aus dem Virus PBCV-1 (*Paramecium bursaria Chlorella Virus-1*) ist der erste von einem Virus codierte, funktionelle Kaliumkanal, der Ähnlichkeit mit eukaryontischen und prokaryontischen Kanalproteinen hat (Plugge *et al.*, 2000). Im Unterschied zu anderen Kaliumkanalproteinen besteht Kcv nur aus einer Porendomäne (P), die zwischen zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) eingebettet ist, und einem kurzen cytoplasmatischen N-Terminus. Die Transmembrandomänen sind durch 44 Aminosäuren voneinander getrennt. Kcv ist mit 94 Aminosäuren der bisher kleinste funktionelle Kaliumkanal. Es ergibt sich also das einfachste Modul TM1-P-TM2 eines Kaliumkanals. Durch seine minimale Größe eignet sich Kcv besonders zur Untersuchung von Struktur- und Funktionszusammenhängen in Kaliumkanalproteinen (Gazzarrini *et al.*, 2003).

Der Kaliumkanal Kesv aus dem *Ectocarpus siliculosus Virus* wurde von Mehmel (2004) näher charakterisiert. Kesv und Kcv sind sehr homologe Proteine. Sie unterscheiden sich lediglich im 30 Aminosäuren längeren N-Terminus. Mehmel zeigte, dass die Pore von Kesv in der Lage ist, einen Kalium-selektiven Kanal zu bilden. Allerdings konnte das Wildtypprotein nicht elektrophysiologisch untersucht werden, da der Kanal im heterologen Expressionssystem nicht in der Plasmamembran, sondern in einem nicht näher bestimmten Kompartiment der Zelle lokalisiert ist. Mehmels Erkenntnisse dienen als Basis dieser Arbeit, deren Hauptziel darin liegt, das Kompartiment zu bestimmen, in welchem Kesv lokalisiert ist, und herauszufinden, wodurch bei zwei sehr ähnlichen viralen Kaliumkanälen ein unterschiedliches *targeting* bedingt wird.

Durch Untersuchungen an viruscodierten Proteinen können Rückschlüsse über entscheidende, für die jeweilige Funktion wichtige Proteinabschnitte in weitaus komplexeren Proteinen gezogen werden. Des Weiteren können sie dabei helfen, noch unbekannte zelluläre Sortierungsmechanismen zu verstehen.

1.2 Intrazellulärer Transport und Sortierung von Proteinen in Eukaryonten

In der vorliegenden Arbeit wurde die unterschiedliche Lokalisation zweier ähnlicher viraler Kanalproteine untersucht. In diesem Teil der Einleitung soll zunächst im Rahmen einer Erläuterung allgemeiner Prinzipien näher auf die Problematik der intrazellulären Proteinsortierung eingegangen werden.

Nach ihrer Translation an den Ribosomen müssen Proteine zu vielen verschiedenen Zielen in der Zelle gelangen, um dort ihre jeweils spezifische Funktion erfüllen zu können: Manche sollen Bestandteile bestimmter Organellen und Organellenmembranen werden, andere im Cytosol verbleiben, weitere sind für den Export bestimmt. Zu den Organellen und ihren Membranen zählen unter anderem der Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Lysosomen, die Peroxisomen, die Mitochondrien und, bei photosynthetisch aktiven Zellen, die Chloroplasten. Die Organellen haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Aufgaben eine individuell angepasste Proteinausstattung, die ihre spezifische Struktur und katalytische Kapazität bestimmt. Im Zellkern ist fast das gesamte Genom einer Zelle kodiert; allerdings werden die Proteine, wie bereits erwähnt, im Cytosol produziert. Hier gibt es aber auch Ausnahmen, denn sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten besitzen Überreste eines eigenen Genoms, von dem noch einige der von ihnen benötigten Proteine kodiert sind. Der Großteil der Chloroplasten- und Mitochondrienproteine muss jedoch importiert werden.

Eine wichtige Erkenntnis, die man über den intrazellulären Proteintransport (*targeting*) erlangte, war, dass die Proteine zum großen Teil eine Signatursequenz tragen, die es der Zellmaschinerie ermöglicht, festzustellen, welches der Zielort des Proteins ist und dieses dementsprechend nur an diesen Ort transportieren kann.

Bei den Signalsequenzen handelt es sich häufig um eine bestimmte Aminosäureabfolge, die die Proteine an ihren Bestimmungsort dirigiert (Alberts *et al.*, 2002). Diese Sequenz bestimmt sehr früh in der Proteinbiosynthese, was mit den jeweiligen an den Ribosomen gebildeten Proteinen geschehen soll. Trägt das Protein ein Signal, das es als ein Protein für den sekretorischen Weg ausweist, so assoziiert das Ribosom an das ER (raues ER) und das Protein wird direkt in das ER-Lumen synthetisiert. Im weiteren Verlauf können die Proteine dann in den Golgi-Apparat und an die Plasmamembran gelangen. Dieser Transport läuft über Vehikel ab. Fehlt ein sekretorische Signal oder sind andere Signale vorhanden, bleiben die Ribosomen

frei im Cytosol und translatiert dort die Proteine, die dann häufig für Mitochondrien, Chloroplasten, Kern, Peroxisomen oder zum Verbleib im Cytosol bestimmt sind (Alberts *et al.*, 2002).

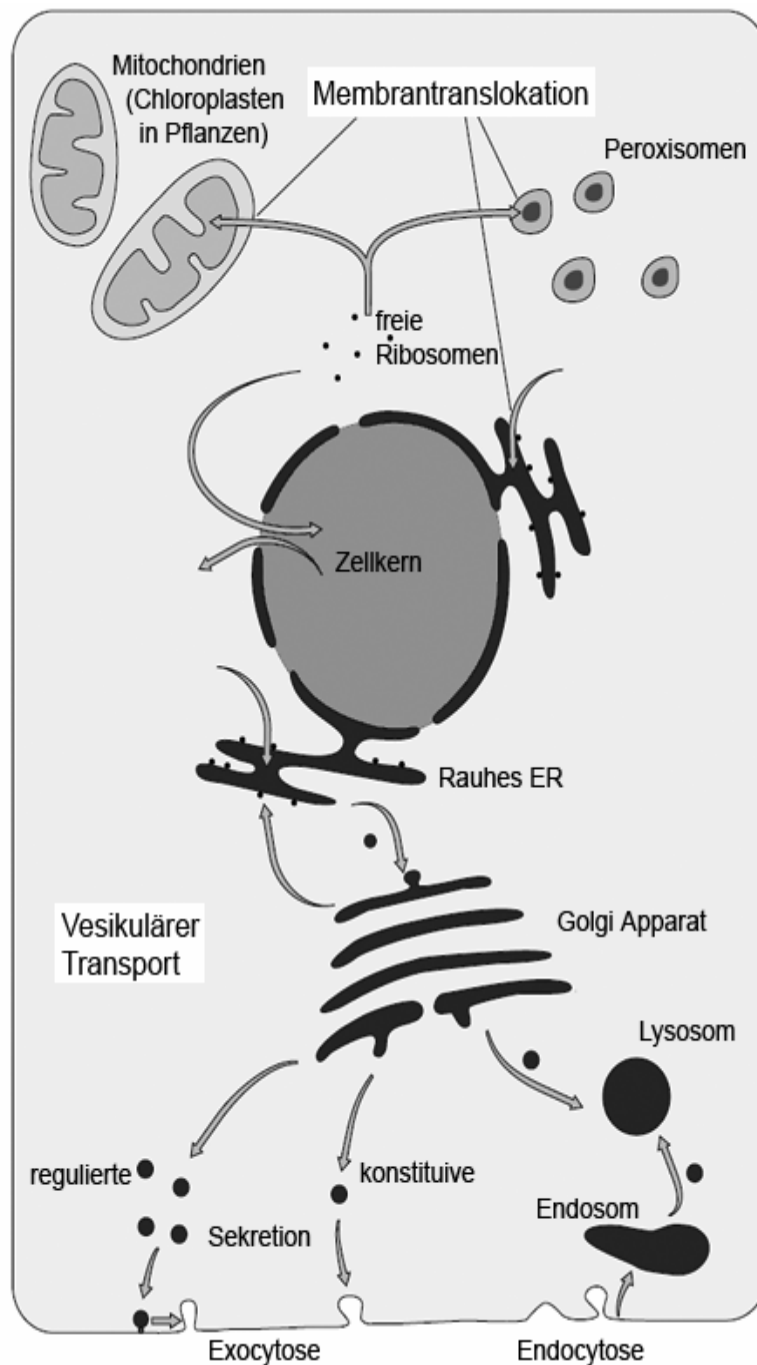


Abbildung 2: Übersicht zur generellen Proteinsortierung in eukaryontischen Zellen. Proteine der Mitochondrien, des Chloroplasten, des Kerns und der Peroxisomen werden von freien Ribosomen gebildet. Proteine des sekretorischen Weges (ER, Golgi, Plasmamembran und Lysosomen) werden von Ribosomen am rauen ER gebildet. Der Transport entlang des sekretorischen Weges läuft über vesikulären Transport ab. Eine Membrantranslokation findet an den Membranen von Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxisomen und am ER statt.

1.2.1 Signalsequenzen

Signalsequenzen umfassen normalerweise 3-80 Aminosäuren, die im Cytosol von spezifischen Rezeptoren erkannt werden. Diese leiten das Protein dann zu seinem Bestimmungsort und nehmen Kontakt mit der jeweiligen Translokationsmaschinerie auf. Häufig wird die Signalsequenz nach erfolgtem Transport in das Zielkompartiment vom Protein abgeschnitten. Es gibt eine Reihe von Signalsequenzen, die unterschiedlich gut charakterisiert sind. Die Zielsequenzen, die Proteine für den Import in das ER markieren, umfassen etwa 5-15 meist hydrophobe Aminosäuren, die am N-Terminus lokalisiert sind (Ng *et al.*, 1996). Wenn Proteine das ER erreicht haben, gibt es weitere Signale, die über deren Verbleib entscheiden, wie zum Beispiel Proteine, die ein Retentionssignal für das ER tragen, d.h. die im ER zurückgehalten werden. Ein solches Signal ist unter anderem auch die Aminosäureabfolge KDEL am C-Terminus des Proteins (Munro und Pelham, 1997). Ebenso existieren ER-Exportsignale. Exemplarisch hierfür sei das zuvor bereits erwähnte diazide Motiv genannt, das aus zwei sauren Aminosäuren, separiert durch eine beliebige Aminosäure, besteht (z.B.: DXE, EXE), die man in cytosolischen Abschnitten im C-Terminus der Proteine findet (Mikosch *et al.*, 2006). Trägt ein Protein in einem Bereich eine Serie von fünf positiv geladenen Aminosäuren, so ist es häufig für den Zellkern bestimmt (Kalderon *et al.*, 1984), wohingegen die C-terminal lokalisierte Aminosäureabfolge SKL bei Proteinen als Signal für die Bestimmung für die Peroxisomen dient (Gould *et al.*, 1987). Auch mitochondriale Proteine tragen häufig eine bestimmte Signalsequenz: Diese besteht aus einem N-terminal gelegenen helicalen Abschnitt von 20-80 Aminosäuren. Dabei ragen auf einer Seite der Helix positiv geladene Aminosäurereste hervor, während auf der anderen Seite hydrophobe Aminosäuren auftreten, wodurch eine amphipatische Helix entsteht (Lithgow, 2000).

1.2.2 Insertion von Membranproteinen

Die Translation und Insertion von Membranproteinen ist ein komplexer Vorgang. Deshalb werden die meisten Proteine auf eine ähnliche Art und Weise in die Membranen eingebaut. Zum einen müssen die hydrophoben Abschnitte, die Transmembrandomänen, in die Membran inseriert werden, zum anderen müssen die hydrophilen Bereiche in einem energieaufwändigen Prozess, der nicht spontan abläuft, durch die hydrophobe Membran geschleust werden. Bei diesem komplexen Proteinapparat, den sich fast alle Lebensformen zur Insertion von Membranproteinen zu Nutze machen, handelt es sich um die Translokationsmaschinerie (Rapoport,

1992; Neupert, 1997; Soll und Schleiff, 2004; Lührink *et al.*, 2005). Die benötigte Energie bezieht sie sowohl aus der Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten als auch aus dem elektrochemischen Potential, das über der Membran anliegt. Erschwerend kommt hinzu, dass während der Translokation die Proteine in ungefalteter Form vorliegen müssen. Das erfordert entweder eine co-translationale Insertion oder aber weitere Hilfsproteine, die Chaperone, welche die entfalten Proteine im Cytosol vor Aggregation und Rückfaltung schützen.

An den Ribosomen des rauen ER wird der größte Teil der Proteine für die Zelle synthetisiert. So entstehen am ER alle Proteine, die in den sekretorischen Weg gehen. Dazu gehören die Proteine des ER, des Golgi-Apparates, der Plasmamembran und der Lysosomen. Die Membranproteine werden ähnlich wie in Prokaryonten prozessiert. Während ihrer Synthese werden sie von Signalerkennungspartikeln (SRP) erkannt. Diese binden an die hydrophoben Abschnitte der gebildeten Proteinkette und die Translation wird gestoppt (Lührink und Dobberstein, 1994; Halic und Beckmann, 2005). Daraufhin wird der Komplex aus Ribosom, Signalerkennungspartikel und entstehender Proteinkette am ER andockt, das Ribosom interagiert mit dem Translocon und der SRP wird abgespalten. Durch die Wechselwirkungen des Translocons mit dem Ribosom wird ein co-translationaler Einbau von Membranproteinen ermöglicht, aber auch lösliche Proteine können dadurch in das Lumen des ER entlassen werden (Johnson und van Waes, 1999).

Neben der co-translationalen Translokation von Protein in das ER gibt es auch die post-translationale Translokation, bei der die Proteine an freien Ribosomen im Cytosol komplett fertig synthetisiert und erst dann ins ER eingebaut werden. Dieser Weg konnte für Proteine, die mit nur einer C-terminalen Transmembrandomäne in Membranen verankert sind (*tail-anchored proteins*), nachgewiesen werden. Erst kürzlich konnte ein Faktor, der an dieser post-translationalen Translokation maßgeblich beteiligt ist, identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine 40 kDa große ATPase (TRC40), die eine Untereinheit des TRC (*cytosolic transmembrane domain recognition complex*) ist. TRC40 scheint wichtig für die Koordination des *targeting* und der Translokation ins ER. Die Identifikation dieser ersten wichtigen Komponente der post-translationalen Translokation sollte dazu führen, dass in Zukunft weitere wichtige Bestandteile dieses Weges entdeckt werden (Stefanovic und Hegde, 2007).

Wie zuvor erwähnt, werden lediglich Proteine des sekretorischen Weges auf diese Weise an ihre Bestimmungsorte gebracht. Für Mitochondrien- und Chloroplastenproteine existieren andere Wege. In beiden Fällen werden die Proteine an freien Ribosomen im Cytosol gebildet und anschließend über unterschiedliche Wege in die Mitochondrien und Chloroplasten integ-

riert. Im Folgenden soll das Hauptaugenmerk auf den Ablauf des mitochondrialen Proteinimports gelegt werden.

Im Kern kodierte mitochondriale Proteine werden in den meisten Fällen an freien Ribosomen gebildet und dann post-translational in die Mitochondrien importiert (Neupert, 1997); es konnte aber auch schon ein co-translationeller Einbau dokumentiert werden (Marc *et al.*, 2002). Die an den freien Ribosomen gebildeten Proteine werden von den Chaperonen der Hsp70- und Hsp90-Familie im Cytosol in einem importfähigen Zustand stabilisiert. Dass Hsp70-Chaperone bei der Proteintranslokation mitwirken, konnte für den Proteinimport in die Peroxisomen (Hettema *et al.*, 1998) und die Mitochondrien gezeigt werden (Mihara und Omura, 1996; Young *et al.*, 2003). Ebenso konnte in Säugerzellen die Bildung eines Proteinkomplexes zwischen Präproteinen und Hsp70 sowie Hsp90 und der Transport zu Importrezeptoren der Mitochondrien nachgewiesen werden (Young *et al.*, 2003b). Eine genauere Betrachtung der Wechselwirkungen zwischen Präproteinen und Chaperonen zeigt, dass Hsp70-Chaperone ungefaltete und teilweise gefaltete Substrate binden, während Hsp90-Chaperonen eine wichtige Rolle bei der endgültigen Faltung zukommt (Young *et al.*, 2001).

Nachdem die Chaperone die gebundenen Präproteine zu den Rezeptoren der äußeren Mitochondrienmembran gebracht haben (Stan *et al.*, 2000), werden sie von Proteinimportkomplexen, von denen bisher fünf bekannt sind, in die Mitochondrien eingeschleust (Wiedemann *et al.*, 2004; Mokranjac und Neupert, 2005). In der Außenmembran befinden sich zwei Proteinkomplexe. Der TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) ist für den Einbau in und den Import über die äußere Membran zuständig (Ahting *et al.*, 2005). Der zweite Proteinkomplex ist der TOB-Komplex (*topogenesis of outer membrane β -barrel-proteins*). Dieser ist für die Insertion von β -Faltblattproteinen in die äußere Membran zuständig. Allerdings werden die β -Faltblatt-Proteine zuerst vom TOM-Komplex importiert, ehe sie im Intermembranraum von den kleinen Tim-Proteinen (*translocase of the inner membrane*) zum TOB-Komplex befördert werden (Paschen *et al.*, 2003; Wiedemann *et al.*, 2003; Hoppins und Nargang, 2004). Proteine, die für den Intermembranraum bestimmt sind, tragen häufig ein konserviertes Cysteinmotiv, welches vom Erv1-Mia40-Komplex erkannt wird (Chacinska *et al.*, 2004). Proteine der inneren Mitochondrienmembran werden von zwei Komplexen integriert: Polytopische, also mehrfach-membrandurchspannende Proteine, werden von den kleinen Tim-Proteinen zum TIM22-Komplex gebracht und von diesem eingebaut (Bauer *et al.*, 2000); Proteine, die eine N-terminale Signalsequenz tragen, werden vom TIM23-Komplex in die Membran integriert.

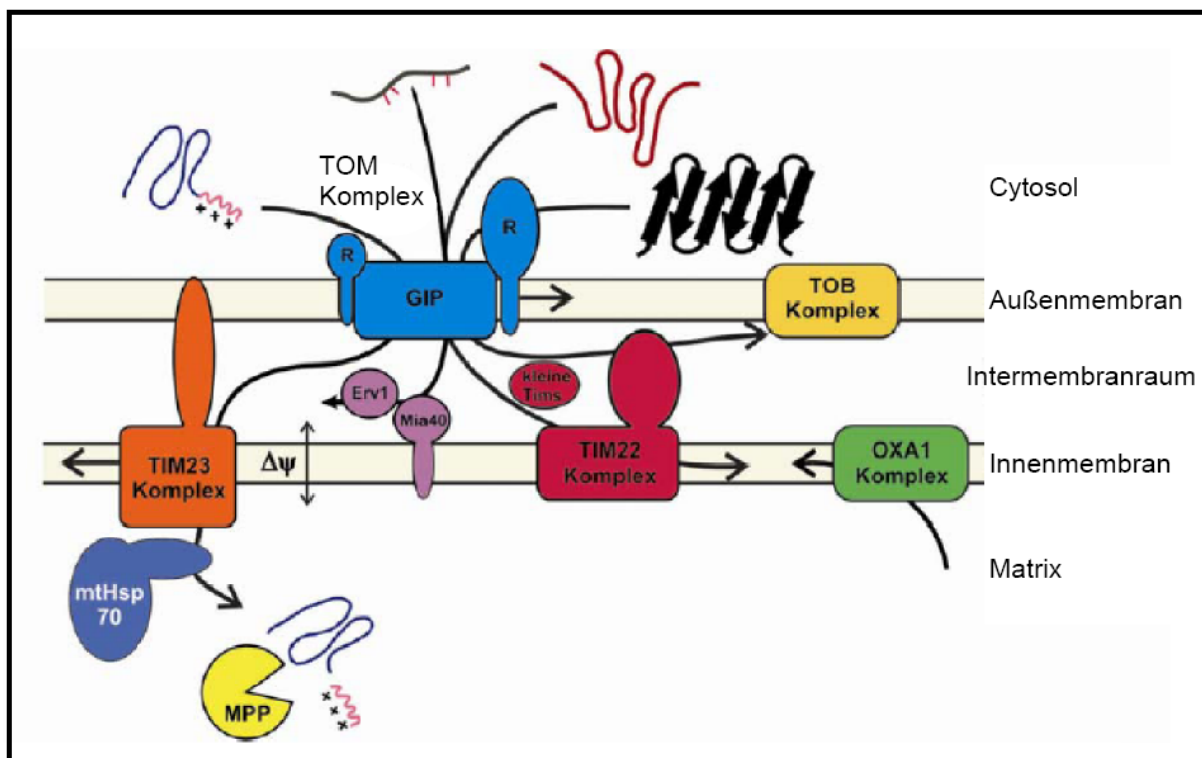


Abbildung 3: Übersicht der Importvarianten in die Mitochondrien. Proteine der äußeren Membran werden über den TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) eingebaut. Dieser Komplex ist gleichzeitig auch für den Transfer von anderen Mitochondrienproteinen über die Außenmembran zuständig. Der TOB-Komplex (*topogenesis of outer membrane β -barrel-proteins*) baut β -Faltblattproteine in die äußere Membran ein. Über die TIM-Komplexe (*translocase of the inner membrane*) werden die vom TOM-Komplex importierten Proteine in die Innenmembran oder über diese in die Matrix gebracht. Der OXA1-Komplex ist für den Einbau von mitochondrial kodierten Proteinen in die innere Membran verantwortlich (aus Sichting, 2007).

Dabei wird ein Unterschied zwischen monotopischen und polytopischen Proteinen gemacht. Monotopische Proteine werden lateral in die Membran integriert (Meier *et al.*, 2005), während polytopische Proteine zuerst in die Matrix eingeschleust werden, wo sie von mitochondrialen Hsp70 stabilisiert werden (Rassow *et al.*, 1994) und von dort in die Membran gebracht werden (Rojo *et al.*, 1995). Ein Großteil aller mitochondrialen Proteine trägt eine N-terminale Signalsequenz. Sie werden, wie erwähnt, vom TIM23-Komplex über und in die innere Membran transportiert. Hierfür sind sowohl ein Membranpotential, das für das Durchschleusen der positiv geladenen Signalsequenz benötigt wird, als auch für die Hydrolyse von ATP notwendig (Neupert und Brunner, 2002). Noch während der Translokation über TIM23 wird die Signalsequenz in der Matrix von Proteasen abgespalten (Schneider *et al.*, 1990).

Beim letzten bekannten Proteinkomplex handelt es sich um den OXA1-Komplex, der verantwortlich für den Einbau von mitochondrial kodierten Proteinen in die innere Membran ist (Hell *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 2001).

Neben den regulären Transportwegen existieren jedoch anscheinend noch weitere bisher unbekannte Wege, die bisher meist nur anhand einzelner Proteine aufgezeigt werden konnten. Als Beispiel hierfür kann das Chloroplastenprotein CAH1 aus *Arabidopsis thaliana* angeführt werden. Dieses wird nicht an freien Ribosomen gebildet und direkt über den TOC- und TIC-Komplex in die Chloroplasten importiert, sondern zuerst in das ER inseriert, dann zum Golgi-Apparat transportiert, in dem es glykosiliert wird, und gelangt von dort über Vesikeltransport zu den Chloroplasten (Villarejo *et al.*, 2005; Radhamony und Theg, 2006). Inzwischen konnte ein weiteres Protein identifiziert werden, das ebenfalls über diesen Weg in die Chloroplasten gelangt. Dabei handelt es sich um die Nukleotid-Pyrophosphatase aus Reis (Nanjo *et al.*, 2006).

1.2.3 Besonderheiten des Proteintransports – Duales *targeting*

Es ist bekannt, dass in eukaryontischen Zellen verschiedene Varianten eines Proteins (Isoproteine) in unterschiedlichen Zellkompartimenten aufzufinden sind. Beispiele hierfür sollen im Folgenden näher ausgeführt werden. Die unterschiedliche Lokalisation kann verschiedene Ursachen haben: zum einen können zwei unterschiedliche Gene für die Proteinvarianten in den Kompartimenten verantwortlich sein, zum anderen kann, falls die Isoproteine von nur einem Gen kodiert sind, die unterschiedliche Verteilung auf der Ebene der Transkription, beim *splicing* oder bei der Translation geregelt sein. Dies kann beispielsweise durch zwei unterschiedliche mRNA eines Genes oder durch zwei verschiedene Transkriptionsstartpunkte einer einzelnen mRNA erreicht werden. All diese Fälle haben zur Folge, dass zwei oder mehrere Translationsprodukte entstehen, die sich durch die An- oder Abwesenheit einer spezifischen Signalsequenz unterscheiden lassen (Danpure, 1995; Small *et al.*, 1998). Doch inzwischen wird eine weitere Möglichkeit für dieses duale *targeting* in Betracht gezogen, bei der nicht zwei oder mehr Translationsprodukte gebildet werden, sondern nur ein einzelnes entsteht.

Einige dieser Fälle, bei denen mindestens ein Translationsprodukt einer Translokation in eine Membran unterliegt, sollen hier beispielhaft erläutert werden. Dabei handelt es sich um Membranen der Mitochondrien, der Chloroplasten, des ER oder der Peroxisomen. Der Kern als Organell ist hier nicht aufgeführt, da der Transport vom Cytosol in den Kern nicht den

gleichen Abläufen der Transmembrantranslokation unterliegt, sondern von den großen Kernporenkomplexen übernommen wird (Alberts *et al.*, 2002).

Das Sortieren eines Proteins in ein Organell umfasst letztendlich drei Schritte: das *targeting* zum Organell, die Interaktion mit Rezeptoren an dessen Oberfläche und die Translokation über die Organellmembran durch die spezifische Importmaschinerie. Die duale Verteilung eines einzelnen Translationsprodukts muss somit innerhalb dieser Schritte geregelt sein. Einige Proteine enthalten zwei Signalsequenzen, was zu einer Verteilung in verschiedene Kompartimente führen kann. Es bleibt allerdings die Frage, wie sich die unterschiedlichen Signale in ein und demselben Protein gegeneinander durchsetzen können. Sobald beide Signale zugänglich sind, sollte die relative Affinität zu den jeweiligen Rezeptoren entscheidend für die Verteilung sein. Diese Konkurrenz zwischen zwei Rezeptoren kommt zum Beispiel auch bei Proteinen vor, die sowohl für die Mitochondrien als auch die Chloroplasten bestimmt sein können (Ruhde *et al.*, 2004). Diese Proteine enthalten eine doppeldeutige Signalsequenz, die den Import in die Mitochondrien sowie in die Chloroplasten ermöglicht. Eine unterschiedliche Verteilung kann auch auftreten, wenn die Signalsequenz nicht mehr für den Zielrezeptor zugänglich ist, was durch die Proteinfaltung, die Bindung anderer Proteine oder posttranslationale Modifikationen verursacht werden kann. Dies kann dazu führen, dass ein bestimmtes Zielkompartiment nicht erreicht wird und die Proteine im Cytosol verbleiben oder aber ein zweites Signal in Erscheinung tritt und das Protein in ein anderes Kompartiment transportiert wird.

Im folgenden Abschnitt sollen an einigen Beispielen die oben erwähnten Möglichkeiten erläutert werden. Meist handelt es sich dabei lediglich um eine Kombination aus den verschiedenen Möglichkeiten und nicht eine individuelle Option.

Die Katalase A (Cta1p) aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzt zwei Signalsequenzen; eine mitochondriale Signalsequenz im N-Terminus und eine Signalsequenz für die Peroxisomen im C-Terminus (Petrova *et al.*, 2004). Die Verteilung zwischen Mitochondrien und Peroxisomen wird durch zellinterne Signale und durch die Wahl der Kohlenstoffquelle im Nährmedium bestimmt. Wie allerdings der Mechanismus genau funktioniert, muss noch aufgeklärt werden.

Verschiedene Proteine der Cytochrome P450-Familie (CYP) werden sowohl ins ER als auch in die Mitochondrien transportiert (Addya *et al.*, 1997; Anandatheerthavarada *et al.*, 1999; Robin *et al.*, 2001). In diesem Fall ist das duale *targeting* durch ein zweiteiliges Signal im N-Terminus bedingt. Es enthält eine ER-Signalsequenz und eine kryptische mitochondriale Sig-

nalsequenz, welche durch post-translationale Modifikationen aktiviert wird. Anhand verschiedener Experimente mit einem Mitglied der Proteinfamilie, CYP2B1, konnte das im Folgenden beschriebene Modell entwickelt werden (Anandatheerthavarada *et al.*, 1999). Anscheinend reguliert sich die relative Affinität der ER-Signalsequenz im Vergleich mit der mitochondrialen Signalsequenz durch die zelluläre cAMP Konzentration und durch Phosphorylierung einer Position im Protein selbst. Der genaue Mechanismus konnte bisher noch nicht erklärt werden (Anandatheerthavarada *et al.*, 2003). Vermutlich wird durch die Phosphorylierung die Assoziierung von CYP2B1 mit dem cytosolischen Chaperon Hsp70, welches essenziell für den Mitochondrienimport ist, durch eine Konformationsänderung im Protein gefördert (Robin *et al.*, 2001; Robin *et al.*, 2002).

Viele Chloroplasten- und Mitochondrienproteine werden im Cytosol gebildet und von dort über bestimmte Wege in ihr Zielkompartiment transportiert. Allerdings gibt es einige Proteine, die in beiden Kompartimenten vorkommen. Diese Proteine tragen ein doppeldeutiges Signal, welches von beiden Importmaschinerien erkannt wird (Silva-Filho, 2003). Vergleiche zwischen doppeldeutigen Signalsequenzen und eindeutigen Chloroplasten- und Mitochondriensignalen zeigen, dass diese sich sehr ähnlich sind. Die doppeldeutigen Signale enthalten vermehrt Leucine und Phenylalanine, was ihnen insgesamt einen hydrophoberen Charakter verleiht (Peeters und Small, 2001). Experimente mit der Glutathionreduktase aus der Erbse zeigten, dass einzelne Aminosäuren eine wichtige Rolle in doppeldeutigen Signalsequenzen spielen. Insbesondere scheinen hydrophobe Aminosäuren im Signal eine Sortierung in Mitochondrien und Chloroplasten zu bedingen, während einzelne positive Aminosäuren im Signalpeptid eine mitochondriale Verteilung erzwingen (Chew *et al.*, 2003).

Im Fall der Adenylat-Kinase (Aky2) aus der Hefe spielt die Faltung des Proteins eine wichtige Rolle im dualen *targeting*. Aky2 kommt zum Großteil im Cytoplasma und nur zu einem geringen Anteil im Intermembranraum der Mitochondrien vor. Das N-terminale Signal kann auch andere Proteine, zwar ebenfalls ineffizient, aber zum Teil in den Intermembranraum transportieren (Egner *et al.*, 1987; Bandlow *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass das Aufteilen von Aky2 zwischen Cytoplasma und Mitochondrien auf einer Konkurrenz zwischen schneller Faltung und dem Erkennen der mitochondrialen Signalsequenz beruht, das nur im entfalteten Protein möglich ist (Bandlow *et al.*, 1998).

Beim *targeting* von Apn1 (*apurinic/apyrimidinic endonuclease*), einem DNA-Reparaturenzym, welches im Kern und den Mitochondrien vorliegt und sowohl eine Signalsequenz im C-Terminus für den Kern als auch für die Mitochondrien im N-Terminus trägt,

kommt es zu Protein-Protein-Wechselwirkungen die eine Signalsequenz maskieren können (Vongsamphanh *et al.*, 2001).

Für das NADH-Cytochrome b5 aus Säugern konnte gezeigt werden, dass die Verteilung zwischen ER und der äußeren Mitochondrienmembran durch eine N-Myristoylation bedingt ist. Diese Modifikation des N-Terminus stört die Wechselwirkung mit dem Signalerkennungspartikel und fördert so den Import in die Mitochondrien (Colombo *et al.*, 2005).

Wie anhand der Beispiele gezeigt werden konnte, ist das duale *targeting* von Proteinen in eukaryontischen Zellen eine weitaus häufigere Erscheinung als bisher wahrgenommen. Wahrscheinlich werden in Zukunft, sobald geringe Mengen von Isoproteinen in verschiedenen Kompartimenten nachgewiesen werden können, noch zahlreiche weitere Proteine gefunden, die diesen Weg beschreiten.

1.3 Aufgabenstellung der Arbeit

Durch Sequenzierung verschiedener Genome von dsDNA Viren wurden Proteine entdeckt, die zum einen eine hohe Homologie zu bekannten Proteinen aus Pro- und Eukaryonten haben, zum anderen aber viel kleiner sind. Diese Kombination aus Funktion und minimaler Proteingröße bietet eine sehr gute Voraussetzung, um grundlegende Funktionsweisen dieser Proteinklassen zu verstehen.

Durch die Beobachtungen von Virus-Zell-Interaktionen konnten schon in der Vergangenheit komplexe zellbiologische Abläufe aufgeklärt werden. Eine in der Zellbiologie interessante und aktuell diskutierte Thematik ist der Mechanismus des dualen *targeting*, d.h. die Eigenschaft mancher Proteine, in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert zu sein (Karniely und Pines, 2005). Dabei geht es vornehmlich um Membranproteine, die sowohl im Endoplasmatischen Retikulum und den Zielkompartimenten des sekretorischen Weges als auch den Mitochondrien lokalisiert sein können (Rehling *et al.*, 2001; Truscott *et al.*, 2003; Wiedemann *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2005; Miyazaki *et al.*, 2005). Im Kontext dieser Fragestellung war es interessant, dass in einer vorhergehenden Arbeit zwei sehr kleine und sehr ähnliche virale Kaliumkanäle untersucht wurden, von denen der eine, Kcv (Kaliumkanal *Paramecium bursaria Chlorella* Virus), in heterologen Systemen in den sekretorischen Weg und der andere, Kesv (Kaliumkanal *Ectocarpus siliculosus* Virus), in eines noch nicht näher definiertes intrazelluläres Kompartiment sortiert wurde. (Mehmel, 2004).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Natur des intrazellulären Zielkompartiment zu eruieren und zu untersuchen, inwieweit Strukturunterschiede zwischen den beiden Kanälen für die unter-

schiedliche Sortierung verantwortlich sind. Im Verlauf der Arbeit ergab sich, dass es sich bei den intrazellulären Kompartimenten, zu denen Kesv sortiert wird, um Mitochondrien handelt. Daraus ergab sich die Frage, nach welchen Kriterien zwei ähnliche Kanalproteine in so unterschiedliche Kompartimente transportiert werden können.

2 Ergebnisse

2.1 Vorangegangene Untersuchungen

Die Genome von PBCV-1 und EsV-1, die beide zu den *Phycodnaviridae* gehören, wurden in Genomprojekten vollständig sequenziert. Dabei konnten bei den beiden sehr großen Genomen von über 300 kbp nur etwa 10 % identische Gene identifiziert werden (Van Etten *et al.*, 2002). Zu diesen Genen gehören unter anderem zwei Kaliumkanäle. Das Protein aus PBCV-1, Kcv, wurde in der Vergangenheit schon in verschiedenen Expressionssystemen erfolgreich als funktioneller Kaliumkanal charakterisiert (Plugge *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2002). Im Rahmen einer früheren Arbeit, die sich mit der Untersuchung des Proteins aus EsV-1, Kesv, beschäftigte, stellte sich heraus, dass Kesv in verschiedenen Expressionssystemen keine reproduzierbare Kaliumleitfähigkeit induzierte. Als Grund für das Fehlschlagen der elektrophysiologischen Charakterisierung konnte, im Vergleich zu Kcv::GFP, der eine messbare Kaliumleitfähigkeit an der Plasmamembran verursacht, eine völlig andere zelluläre Verteilung des Kesv::GFP Fusionsproteins in HEK293-Zellen nachgewiesen werden (Mehmel, 2004).

Auf die Befunde Mehmel aufbauend, wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht, in welchem Zellkompartiment Kesv lokalisiert ist und welche Strukturen innerhalb der Proteine für die unterschiedliche Sortierung innerhalb der Zelle verantwortlich sind. Im folgenden Abschnitt werden die beiden Kaliumkanäle Kcv und Kesv, die bereits von Mehmel (2004) im direkten Vergleich untersucht wurden, vorgestellt.

2.2 Vergleich der Primär- und Sekundärstruktur von Kcv und Kesv

Bei Kcv handelt es sich um ein 94 Aminosäuren großes Protein mit Merkmalen eukaryontischer Kaliumkanäle (Plugge *et al.*, 2000). Dazu gehören zwei Transmembrandomänen, zwischen denen sich die *turret*-Domäne und der Selektivitätsfilter befinden. Zudem verfügt der Kanal über einen kurzen cytoplasmatischen N-Terminus, der zwölf Aminosäuren umfasst. Der C-Terminus ist Teil der zweiten Transmembrandomäne, das bedeutet, dass Kcv ein cytoplasmatischer C-Terminus fehlt.

Kesv ist im Vergleich zu Kcv mit 124 Aminosäuren etwas länger. Er beinhaltet ebenfalls die oben genannten typischen Merkmale von Kaliumkanälen. Stellt man die Aminosäuresequenzen beider Kanäle einander gegenüber, so wird offenkundig, dass sich die Kanäle sehr ähnlich sind: Sie bestehen zu 26 % aus identischen und zu 51 % aus homologen Aminosäuren.

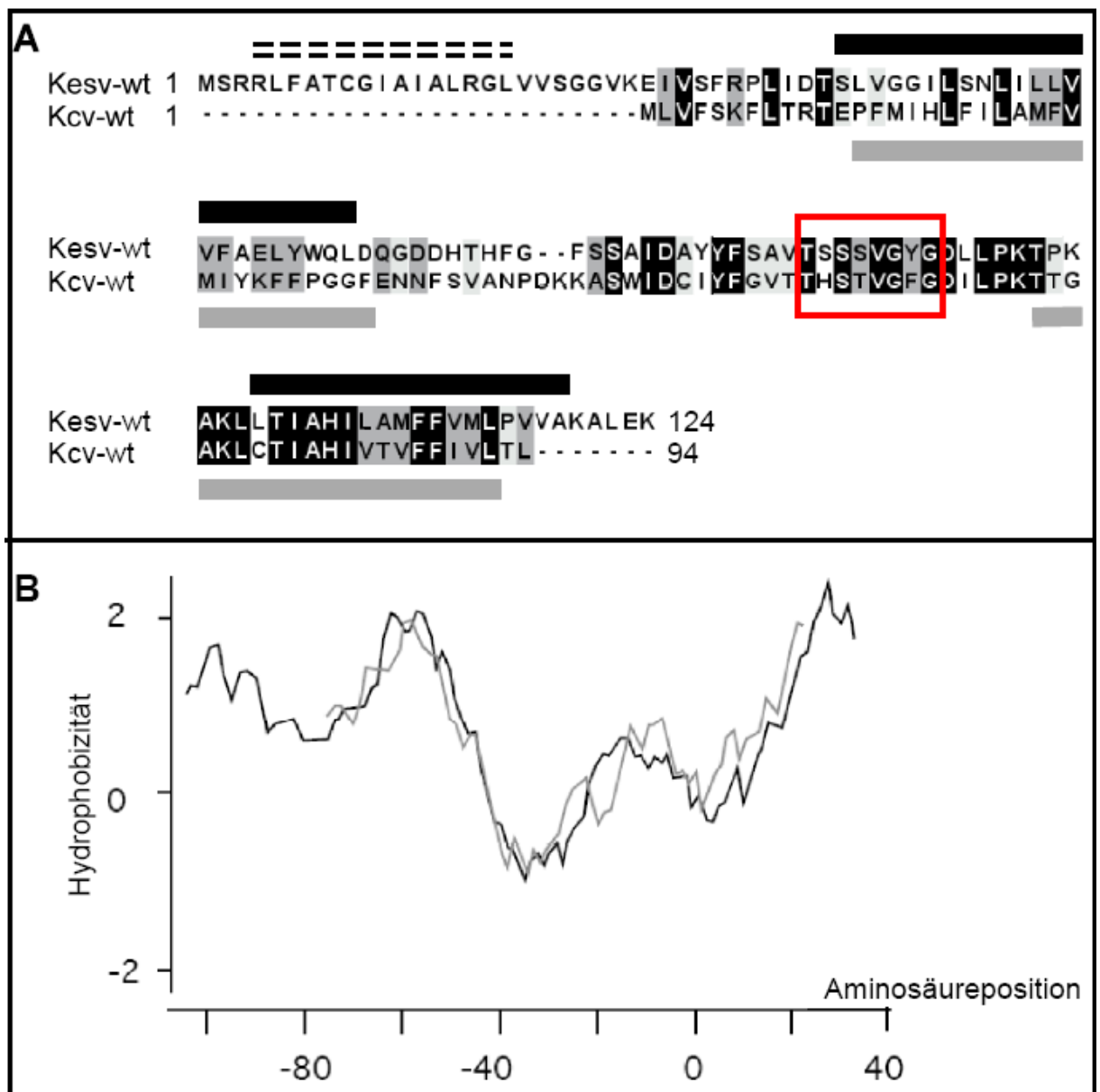


Abbildung 4: **(A)** Alignment von Kesv und Kcv; identische Aminosäuren sind schwarz und homologe Aminosäuren je nach Grad der Homologie dunkelgrau (hohe Ähnlichkeit) bis hellgrau (geringere Ähnlichkeit) dargestellt. Die Transmembrandomänen von Kesv sind mit schwarzen und die von Kcv mit grauen Linien gekennzeichnet; die schwarze doppelt gestrichelte Linie hebt einen α -helicalen Bereich im N-Terminus von Kesv hervor. Die Kaliumkanal-Signatursequenz ist mit roter Umrandung hervorgehoben. **(B)** Hydrophobizitätsplot von Kesv (schwarz) und Kcv (grau) berechnet nach dem Kyle-Doolittle Algorithmus mit einem Fenster von 15 Aminosäuren. Die beiden Sequenzen wurden auf die gemeinsame Kaliumkanal-Signatursequenz normalisiert.

Bei genauerer Betrachtung des Alignments fällt sofort der längere N-Terminus von Kesv auf; der etwa 36 Aminosäuren lang ist. Eine besonders deutliche Übereinstimmung erkennt man in

der Porenregion: Diese ist, wie bereits erwähnt, in allen Kaliumkanälen hoch konserviert und wird auch als Kaliumkanal-Signatursequenz bezeichnet. Bei diesem Sequenzmotiv handelt es sich um die Aminosäuren TXXTXGY/FG, wobei die mit X gekennzeichneten Positionen von Kanal zu Kanal variieren können. Die konservierten Aminosäuren bilden mit ihrem Aminosäurerückgrat den Selektivitätsfilter des Kanals. Bei Kcsv ist zusätzlich zu den sonst variablen Aminosäuren der Signatursequenz ein Austausch des zweiten konservierten Threonins durch ein Serin zu beobachten. Diese Variante im Selektivitätsfilter ist bei zwei weiteren Kaliumkanälen, dem Eag-Kanal aus *Drosophila melanogaster* und dem HERG-Kanal aus *Homo sapiens*, bekannt. Wird bei Kcv das zweite Threonin zu einem Serin mutiert, so wird der zuvor von Barium blockierbare Kcv (Plugge *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2002) insensitiv gegenüber Barium (Gazzarrini, unveröffentlichte Daten).

Weitere stark konservierte Bereiche der Proteine finden sich stromabwärts nach dem Selektivitätsfilter in Richtung C-Terminus. In diesem Abschnitt liegt die zweite Transmembrandomäne. Sie weist eine hohe Homologie von 74 % und eine Identität von 47 % auf (Abbildung 5).

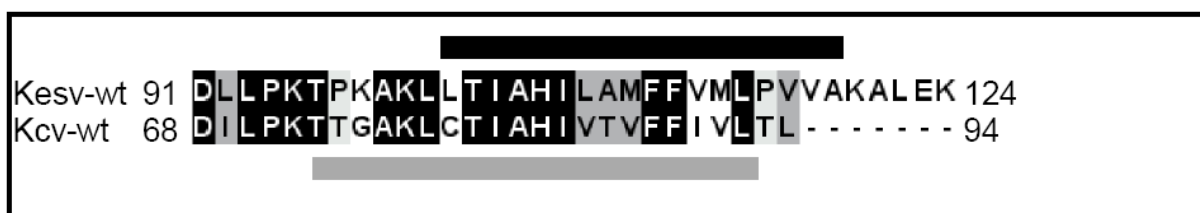


Abbildung 5: Alignment der Region stromabwärts nach dem Selektivitätsfilter von Kcsv und Kcv; identische Aminosäuren sind in schwarz und homologe Aminosäuren je nach Grad der Homologie von dunkelgrau (hohe Ähnlichkeit) bis hellgrau (geringere Ähnlichkeit) dargestellt. Die Lage der zweiten vorhergesagten Transmembrandomäne von Kcsv ist mit einer schwarzen und die von Kcv mit einer grauen Linie gekennzeichnet.

Zur Ermittlung einer sekundären Proteinstruktur wird häufig zuerst ein Hydrophobizitätsplot erstellt, durch den besonders hydrophobe Bereiche des Proteins auffindig gemacht werden. Bei diesen sehr hydrophoben Abschnitten handelt es sich oft um membrandurchspannende Domänen des Proteins. Unter Verwendung weiterer Programme, wie beispielsweise TMHMM (*transmembrane prediction using Hidden Markov models*), das in verschiedenen Versionen (TMHMM 1.0, 2.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998) und TMHMMfix auf Basis von 2.0 (Melén *et al.*, 2003)) vorliegt, können Transmembrandomänen eines Proteins vorhergesagt werden. Dazu greifen die Programme auf Datenbanken zurück, in denen Proteine mit bereits

aufgeklärter Struktur verzeichnet sind und gleichen die Anfrage damit ab. Tabelle 1 enthält die Transmembrandomänvorhersagen der erwähnten Programme für Kesv, Kcv und die jeweiligen Fusionsproteine. Vorhersagen mit TMHMM 1.0 zeigen keinen Unterschied zwischen Kesv und Kcv auf. Unter Verwendung von TMHMM 2.0 und TMHMMfix 2.0 werden für die Kesv-wt und Kcv-wt unterschiedlich lange TM2 erwartet; wobei die TM2 von Kesv um zwei Aminosäuren kürzer ist.

Tabelle 1: Transmembranvorhersagen mit drei Versionen des Algorithmus TMHMM. Aufgelistet sind die Ergebnisse für die Transmembranvorhersagen von Kesv, Kcv, Kesv::GFP und Kcv::GFP.

Konstrukte	TMHMM 1.0				TMHMM 2.0				TMHMMfix 2.0			
	TM1		TM2		TM1		TM2		TM1		TM2	
	von bis	Länge	von bis	Länge	von bis	Länge	von bis	Länge	von bis	Länge	von bis	Länge
Kcv wt	13- 35	23	74- 92	19	13- 35	23	73- 92	20	13- 35	23	73- 92	20
Kesv wt	37- 59	23	101- 119	19	37- 59	23	102- 119	18	37- 59	23	102- 119	18
Kcv::GFP	13- 35	23	74- 92	19	13- 35	23	79- 98	20	13- 35	23	79- 98	20
Kesv::GFP	37- 59	23	101- 119	19	34- 56	23	100- 122	23	37- 59	23	103- 122	20

In Tabelle 1 sind allerdings nur die vermeintlichen Transmembrandomänen TM1 und TM2 aufgeführt. Vorhersagealgorithmen berechnen manchmal weitere Transmembrandomänen, die sich experimentell jedoch nicht bestätigen lassen. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die ausgegebenen Vorhersagen unter Verwendung von TMHMM 2.0. Die Vorhersage gibt für das Fusionsprotein Kesv::GFP vier Transmembrandomänen an (Abbildung 6B). Die dritte vorhergesagte Domäne ist identisch mit der Porenhelix des Kanals und ist damit keine Transmembrandomäne. Auch bei der ersten vorhergesagten Transmembrandomäne handelt es sich zwar um einen sehr hydrophoben Bereich im N-Terminus, der potentiell eine Transmembrandomäne darstellen könnte, aber von anderen Vorhersagealgorithmen nicht als solche erkannt wird.

Vielmehr könnte es sich aufgrund der α -helicalen Struktur und der enthaltenen positiven Aminosäuren um ein Signalpeptid handeln. Festzuhalten bleibt, dass die Verwendung solcher Algorithmen immer fehlerbehaftet ist; denn es handelt sich bei den Vorhersagen nur um wahrscheinliche bzw. mögliche Strukturen. Genauere Vorhersage können nur erreicht werden, wenn durch Experimente weitere Strukturparameter des betreffenden Proteins bekannt sind. Beispielsweise führt das Wissen über die Lage des N- oder C-Terminus oder bekannter Strukturen wie dem Selektivitätsfilter bei Kaliumkanälen zu einer verlässlicheren Vorhersage. Die erweiterte Version des TMHMM-Algorithmus, TMHMMfix, berücksichtigt solche Parameter und erreicht dadurch verbesserte Vorhersagen.

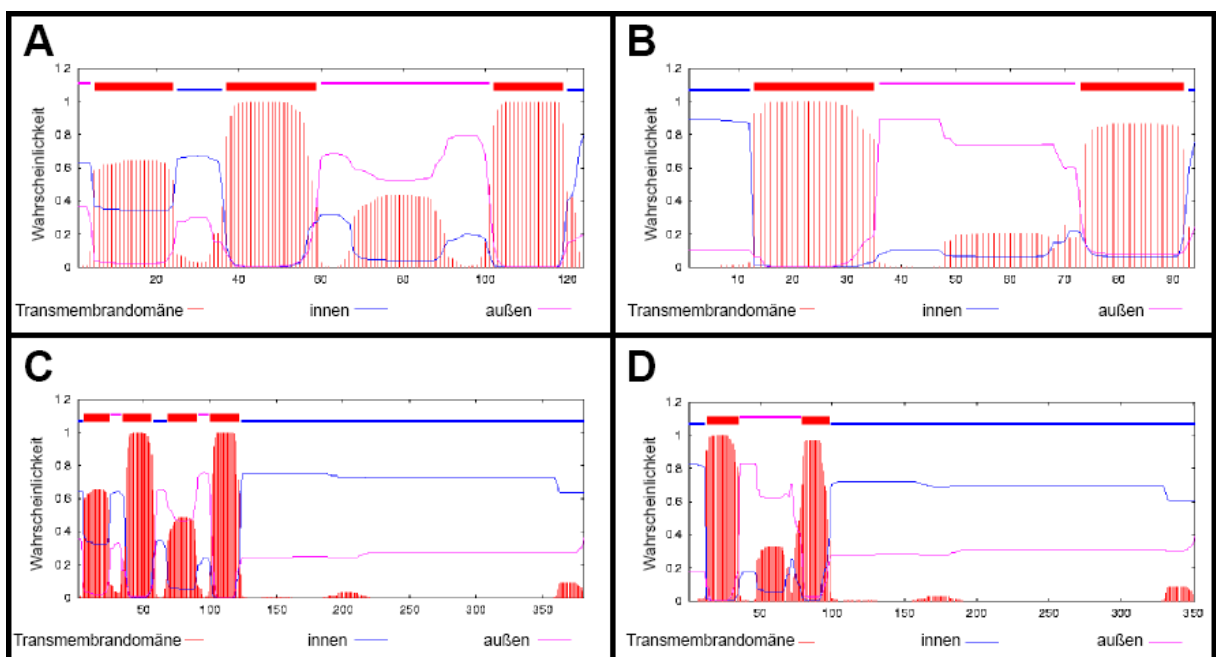


Abbildung 6: Graphische Ausgabe der Vorhersagen mit dem Algorithmus TMHMM 2.0. Für Kcsv-wt (A) wurden drei, während für das Fusionsprotein Kcsv::GFP (C) vier Transmembrandomänen vorhergesagt werden. Bei den Vorhersagen für Kcsv (B) und Kcsv::GFP (D) besteht kein Unterschied in der Anzahl der Transmembrandomänen.

2.3 Vorhersagen von Signalsequenzen und der wahrscheinlichen Lokalisation von Kcsv und Kcsv

Vor dem Hintergrund, dass Kcsv::GFP und Kcsv::GFP in HEK293-Zellen in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu finden sind (Mehmel, 2004), stellte sich die Frage, welche Abschnitte bzw. Aminosäuren innerhalb des Proteins für die ungleiche Lokalisation verantwortlich sind. Es steht eine Reihe von Programmen zur Verfügung, die dabei helfen können, vorherzusagen,

ob ein unbekanntes Protein eine Signalsequenz für ein bestimmtes Zellorganell enthält und welches Zellkompartiment der wahrscheinlichste Zielort des Proteins nach der Translation sein könnte. Zu diesen Programmen gehören unter anderem pSORT II, für die Vorhersage in Säugerzellen und Hefen, und pSORT, welches für die Vorhersage in Pflanzenzellen genutzt werden kann (Nakai und Hornton, 1999). Beide Programme suchen in der Proteinsequenz nach verschiedensten bereits bekannten Signalsequenzen. Des Weiteren gibt es die Programme TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000), welches die Wahrscheinlichkeit für die Verteilung des untersuchten Proteins in den Zellkompartimenten ausgibt, und Mitoprot II (Claros und Vincens, 1996), das speziell nach Erkennungssequenzen für den Mitochondrienimport sowie nach möglichen Schnittstellen, die für das Entfernen der Signalsequenzen benötigt werden, sucht. Diese Programme können, im Rahmen ihrer jeweiligen technischen Voraussetzungen, auf pflanzliche und tierische Systeme angewandt werden, wobei der Unterschied darin besteht, dass in der pflanzlichen Zelle mit den Chloroplasten ein zusätzliches Zellkompartiment vorhanden ist. Dieses wird in der Vorhersage extra berücksichtigt. Im Fall von Kcv und Kesv wurden die Programme, sofern möglich, sowohl für Pflanzen- als auch für tierische Zellen ausgeführt. Wie die Erfahrung zeigt, ist es unumgänglich, mehrere Programme zu verwenden, da jedes Programm andere Kriterien zur Vorhersage heranzieht und sich die Ergebnisse daher teilweise deutlich unterscheiden können.

Um zunächst mögliche versteckte und somit bereits bekannte Signalsequenzen wie zum Beispiel für ER-Retention, Mitochondrienimport und Golgi-Export ausfindig zu machen, wurde zunächst pSORT II auf die Proteine Kesv, Kcv und die jeweiligen Fusionsproteine mit GFP angewandt. Dabei konnten keine speziellen Erkennungssequenzen innerhalb der Proteine erkannt werden. Für alle getesteten Proteine wurde mit höchster Wahrscheinlichkeit das ER als Hauptzielort angegeben und lediglich geringe Wahrscheinlichkeiten für andere Kompartimente (siehe Tabelle 2).

Im Vergleich dazu gibt die Anwendung von TargetP 1.1 mit der Vorgabe „nicht-pflanzlich“ für Kcv und das Fusionsprotein mit GFP einer hohen Wahrscheinlichkeit von 0.935 eine klare Vorhersage für den sekretorischen Weg, nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit von 0.02 für ein mitochondriales Signalpeptid und eine Wahrscheinlichkeit von 0.135 für andere Signale aus. Führt man das Programm dagegen für die Sequenzen von Kesv und Kesv::GFP aus, so kann kein eindeutiger Aufenthaltsort bestimmt werden, denn sowohl Mitochondrien als auch der sekretorische Weg erreichen hier sehr ähnliche Werte. Wird das Programm mit der Vorgabe „pflanzliches System“ ausgeführt, so werden Kcv und Kcv::GFP auch in diesem Fall im sekretorischen Weg erwartet. Die Wahrscheinlichkeit für einen anderen als den sekretorischen

Weg nimmt zwar in der Vorhersage für das pflanzliche System zu, bleibt aber weit unter der des sekretorischen Wegs (Tabelle 3). Für Kcsv und Kcsv::GFP erhält man auch im Falle der Vorgabe Pflanzenzelle kein eindeutiges Ergebnis für die Lokalisation. Eine Verteilung in die Mitochondrien kommt ebenso in Frage wie diejenige für den sekretorischen Weg und in andere Kompartimente. Allerdings kann hier bei einer sehr kleinen Wahrscheinlichkeit von 0.018 eine Lokalisation in den Chloroplasten wohl ausgeschlossen werden.

Tabelle 2: Vorhersagen für die zelluläre Lokalisation der viralen Kanäle nach Berechnung mit den Programmen pSORT und pSORT II. Auflistung der Vorhersagen für Kcsv, Kcv und die jeweiligen Fusionsproteine mit GFP mit den Wahrscheinlichkeiten für das jeweilige Kompartiment.

Konstrukte	pSORT II (nicht-pflanzlich)				pSORT (pflanzlich)			
	ER	PM	Mitochondrien	Cytosol	PM	Golgi	ER-Membran	ER-Lumen
Kcv	44.4	11.1	11.1	11.1	0.64	0.46	0.69	0.1
Kcv::GFP	44.4	11.1	11.1	11.1	0.64	0.46	0.69	0.1
Kcsv	55.6	22.2	11.1	11.1	0.64	0.46	0.37	0.1
Kcsv::GFP	66.7	22.2	-	11.1	0.64	0.46	0.37	0.1

Tabelle 3: Vorhersagen des Programms TargetP 1.1. Ausgegebene Wahrscheinlichkeiten für das Vorhandensein eines mitochondrialen Signalpeptids (mTP), eines Signals für den sekretorischen Weg (SP) und eines Signals für andere Signale (andere) in Kcsv, Kcv und den Fusionsproteinen.

Konstrukte	TargetP 1.1 (nicht-pflanzlich)			TargetP 1.1 (pflanzlich)			
	mTP	SP	Andere	cTP	mTP	SP	Andere
Kcv	0.02	0.94	0.14	0.002	0.19	0.96	0.08
Kcv::GFP	0.03	0.79	0.12	0.001	0.24	0.96	0.10
Kcsv	0.63	0.70	0.01	0.02	0.28	0.31	0.32
Kcsv::GFP	0.63	0.70	0.01	0.02	0.29	0.30	0.32

Da nach der Verwendung von TargetP 1.1 im Falle von Kcsv keine eindeutige Vorhersage für die Mitochondrien oder den sekretorischen Weg getroffen werden konnte, wurde ein weiteres Programm verwendet, welches speziell und ausschließlich nach N-terminalen Mitochondrien-importsignalen und deren möglicher Länge bzw. möglichen Schnittstellen sucht. Dabei konnte für beide Kcsv-Proteinvarianten eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit von etwa 80 % für den

Import in die Mitochondrien ermittelt werden. Zum Vergleich wurde auch Kcv untersucht, für den eine wesentlich geringere Wahrscheinlichkeit von etwa 15 % berechnet wurde (siehe Tabelle 4).

Aufgrund der von Mitoprot II ermittelten Wahrscheinlichkeiten liegt die Annahme nahe, dass im N-Terminus von Kesv ein Mitochondrienimportsignal enthalten ist. Im folgenden Abschnitt soll dies experimentell untersucht werden.

Tabelle 4: Vorhersage für den Mitochondrienimport mit Mitoprot II. Aufgelistet sind die Wahrscheinlichkeiten für den Import und die Länge bzw. Sequenz eines möglichen Signalpeptids von Kesv, Kcv und den Fusionsproteinen.

Konstrukte	MitoProt	Mögliches Signalpeptid	Länge
Kcv	0.15	MLVFSKFLTRT	12
Kcv::GFP	0.13	MLVFSKFLTRT	12
Kesv	0.83	MSRRLFATCGIAIALRGLVVSGGVK	25
Kesv::GFP	0.82	MSRRLFATCGIAIALRGLVVSGGVK	25

2.4 Lokalisationsstudien Kcv und Kesv

Vorangegangene Untersuchungen (Mehmel, 2004) wiesen nach, dass die Fusionsproteine Kcv::GFP und Kesv::GFP in den heterologen Expressionssystemen HEK293- und CHO-Zellen in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorzufinden sind. Kcv::GFP exprimierende Zellen zeigen Fluoreszenzsignale im perinukleären Ring, im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat. An der Plasmamembran konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden, was daran liegen könnte, dass dort nicht genügend Kanäle eingebaut werden und damit ein zu schwaches Fluoreszenzsignal vorliegt, welches nicht detektierbar ist. Da aber durch elektrophysiologische Untersuchungen mit Hilfe der *patch-clamp*-Methode eine Kaliumkanalleitfähigkeit festgestellt werden konnte (Plugge *et al.*, 2000; Gazzarini *et al.*, 2006), kann davon ausgegangen werden, dass Kcv::GFP in der Plasmamembran exprimiert wird.

Kesv::GFP ist im Gegensatz dazu nur in punktförmigen Strukturen in der Zelle lokalisiert (Mehmel, 2004). Um welche Strukturen es sich hierbei handelt und wieso beide Kanäle trotz der hohen Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorliegen, soll im Folgenden geklärt werden.

Zur Identifikation von Zellkompartimenten existiert eine Reihe von Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch Kompartimente der Zelle markieren können. Im Rahmen der vorliegenden Ar-

beit wurden zwei verschiedene Farbstoffe verwendet, zum einen LysoTracker Red, durch den die Lysosomen detektiert werden können, und MitoTracker Red, der die Mitochondrien fluoreszenz-markiert.

Auf der Suche nach dem Zellkompartiment, in dem Kesv lokalisiert ist, wurde spekuliert, dass Kesv::GFP in den Lysosomen vorzufinden sein könnte. Die Idee war, dass das Protein im heterologen Expressionssystem nicht richtig gefaltet wird und sich deshalb in den Lysosomen befindet, in denen falsch gefaltete Proteine abgebaut werden. Wie in Abbildung 7A ersichtlich, befindet sich Kesv::GFP jedoch nicht in den Lysosomen. Die Fluoreszenzsignale des LysoTracker Red und des GFP sind nicht kolokalisiert, woraus geschlossen werden kann, dass sich das Kanalprotein in einem anderen Kompartiment befindet.

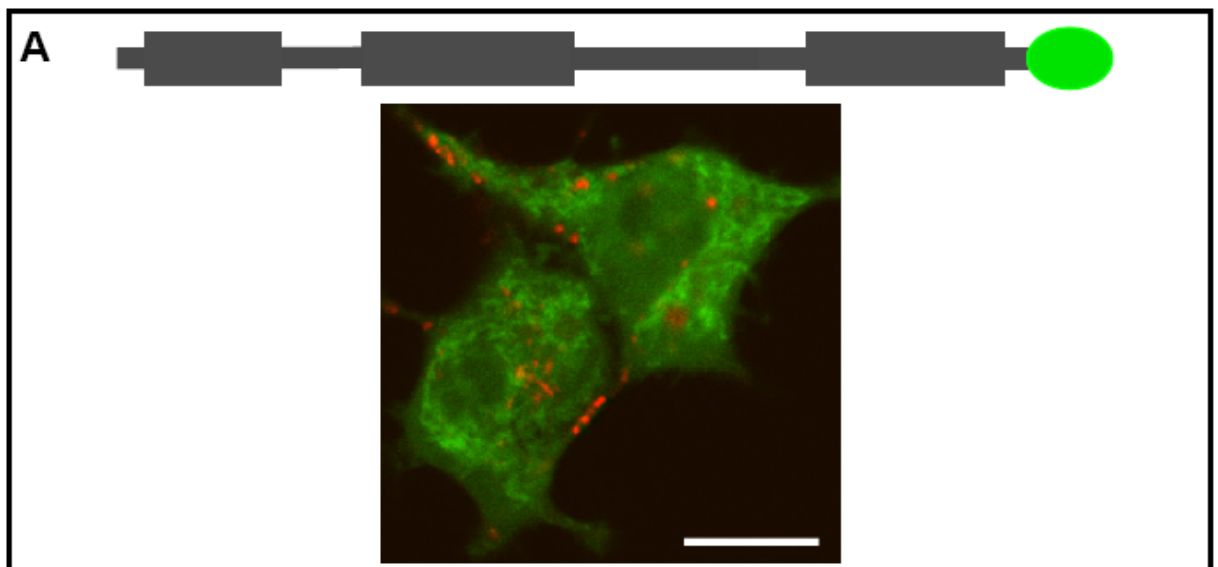


Abbildung 7A: Kesv::GFP kolokalisiert nicht mit LysoTracker Red; Overlay der CLSM-Aufnahmen einer Kesv::GFP (grün) transfizierten HEK293-Zelle inkubiert mit LysoTracker Red (rot). Der Größenbalken entspricht 10 μ m.

Als ein weiteres Zellorganell wurden die Mitochondrien mit MitoTracker Red fluoreszenz-markiert. In diesem Fall konnte eine Übereinstimmung der Fluoreszenzsignale von Kesv::GFP und MitoTracker Red festgestellt werden (Abbildung 7B-a,b,c,d). Graue Pixel zeigen, dass nahezu sämtliche grüne und rote Pixel kolokalisieren (Abbildung 7B-c).

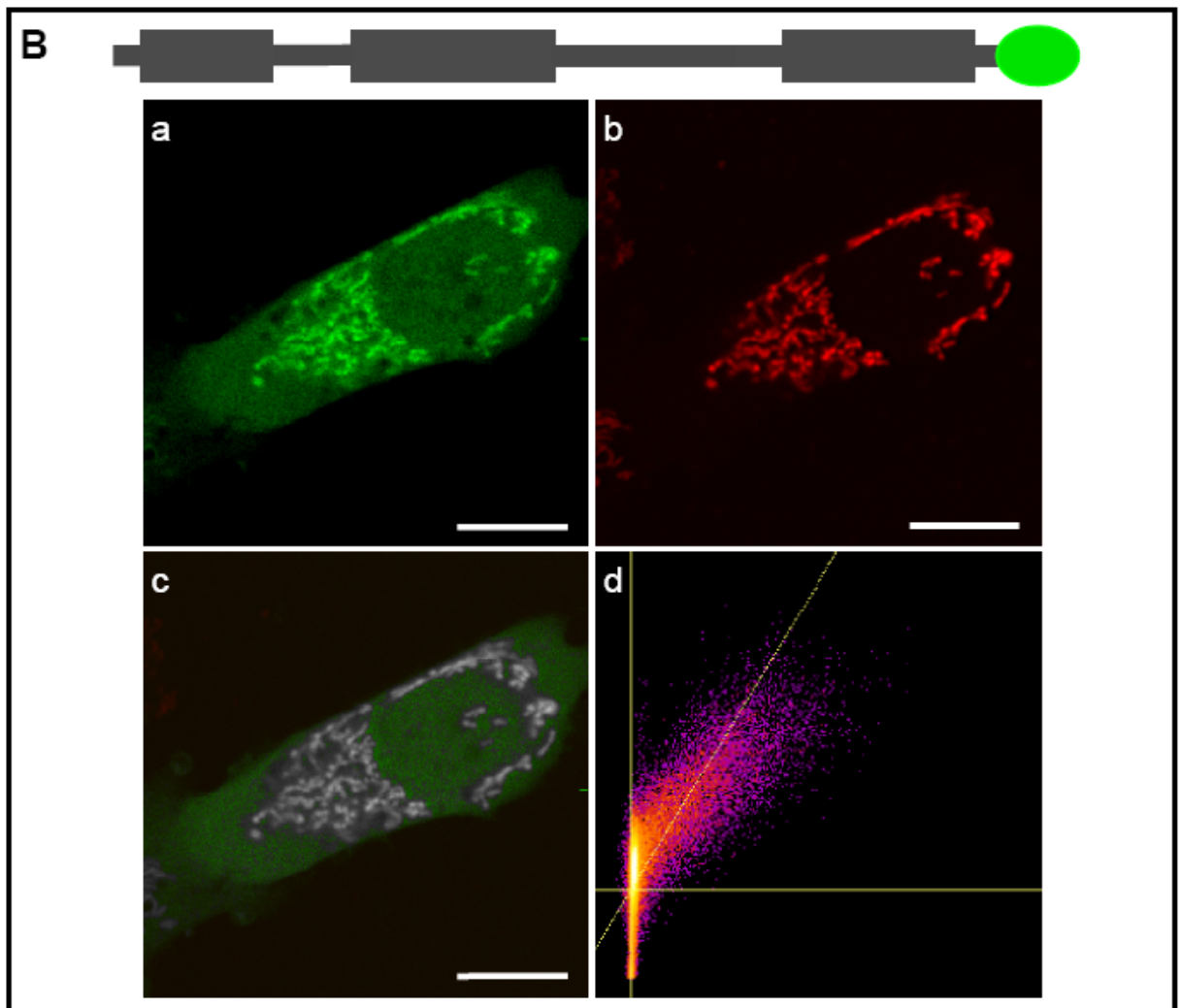


Abbildung 7B: Kesv kolokalisiert mit MitoTracker Red; CLSM-Aufnahmen einer mit Kesv::GFP (grün) transfizierten HEK293-Zellen (a) und MitoTracker Red (rot) (b). Im Overlay der beiden Aufnahmen (c) sind kolokalisierte Pixel in grau hervorgehoben. Der *scatter-plot* (d) veranschaulicht die Überlagerung der grünen und roten Pixel innerhalb Zelle. Die gelben Linien (waagrecht und senkrecht) zeigen den *threshold* für beide Fluoreszenzen. Die gelbe Diagonale stellt die Regressionsgerade dar. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Zum Vergleich wurde die Anfärbung mit MitoTracker Red auch mit Kcv::GFP durchgeführt. In Abbildung 7C ist zu erkennen, dass Kcv::GFP nicht mit den Mitochondrien kolokalisiert ist. Die kolokalisierten Pixel in Abbildung 7C-c kommen dadurch zustande, dass ER und Mitochondrien innerhalb der Zelle sehr eng zusammen liegen können, dies kann jedoch nicht aufgelöst werden und erscheint deshalb als vermeintliche Kolokalisation. Auch der *scatter-plot* (Abbildung 7C-d) macht deutlich, dass im Vergleich zu Kesv::GFP wesentlich weniger kolokalisierte Pixel vorhanden sind.

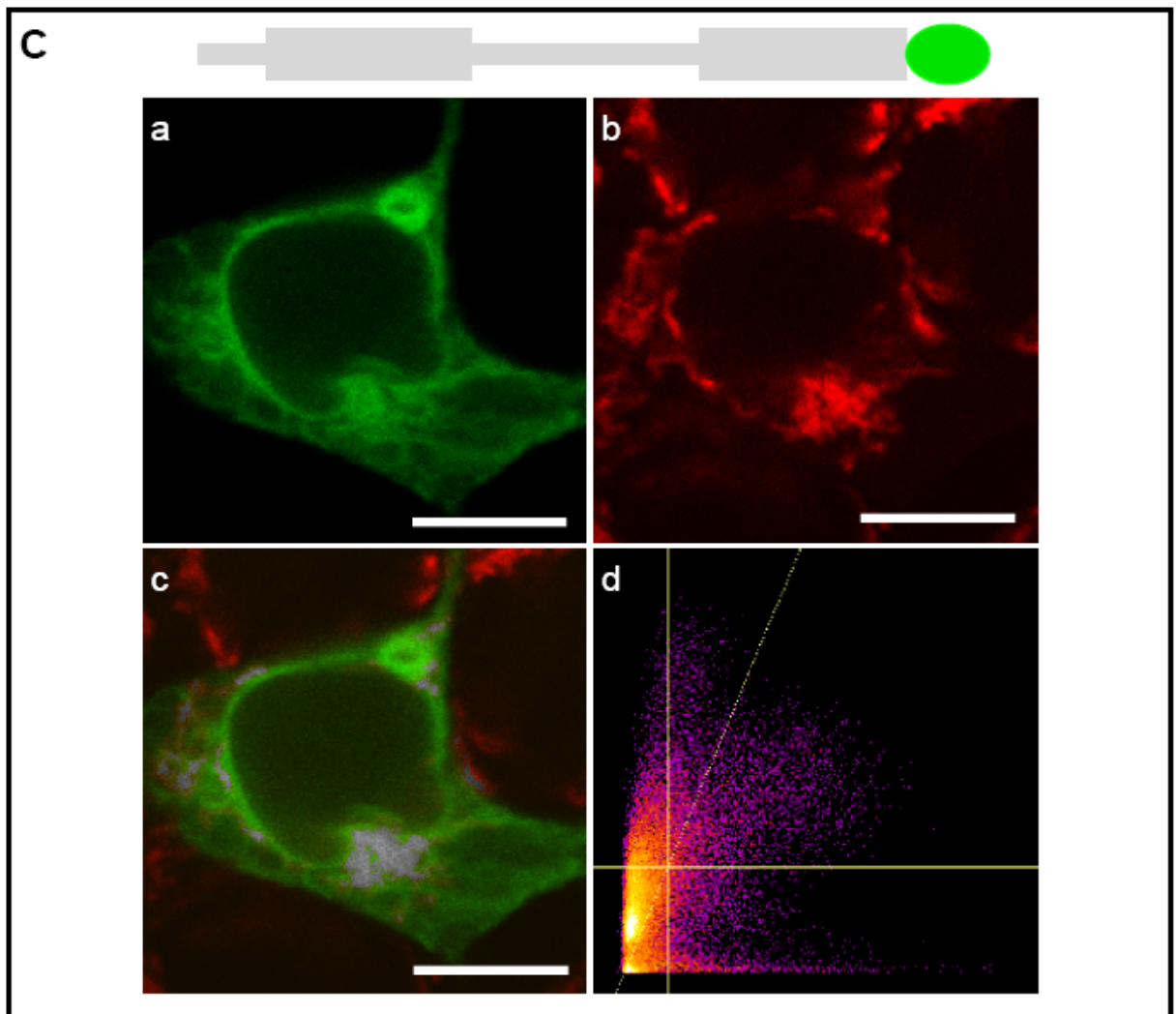


Abbildung 7C: Kcv kolokalisiert nicht mit MitoTracker Red; CLSM-Aufnahmen einer mit Kcv::GFP (grün) transfizierten HEK293-Zellen (a) und MitoTracker Red (rot) (b). Im Overlay der beiden Aufnahmen (c) sind kolokalisierte Pixel in grau hervorgehoben. Der *scatter-plot* (d) veranschaulicht die Überlagerung der grünen und roten Pixel innerhalb Zelle. Die gelben Linien (waagrecht und senkrecht) zeigen den *threshold* für beide Fluoreszenzen. Die gelbe Diagonale stellt die Regressionsgerade dar. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

2.5 Kesv::GFP ist fest mit den Mitochondrien assoziiert

Im Anschluss an die Kolokalisation von Kesv::GFP mit MitoTracker Red stellte sich die Frage, ob Kesv::GFP fest in die Mitochondrien integriert oder vielleicht nur an die Mitochondrien assoziiert ist. Daher wurden Kesv::GFP transfizierte Zellen aufgeschlossen und die Mitochondrien durch verschiedene Zentrifugationsschritte von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Die dadurch isolierten Mitochondrien wurden mit MitoTracker Red inkubiert, um sie unter dem Fluoreszenzmikroskop leichter ausmachen zu können. Weiterhin war es möglich,

intakte von zerstörten Mitochondrien zu unterscheiden, da MitoTracker Red eine vom Membranpotential abhängige Fluoreszenz zeigt und daher nur intakte Mitochondrien anfärbt.

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, konnten intakte Mitochondrien isoliert werden, da diese neben einer GFP-Fluoreszenz auch ein Fluoreszenzsignal von MitoTracker Red zeigten. In welchen Abschnitten innerhalb der Mitochondrien Kesv::GFP lokalisiert ist, konnte anhand der isolierten Mitochondrien jedoch nicht geklärt werden.

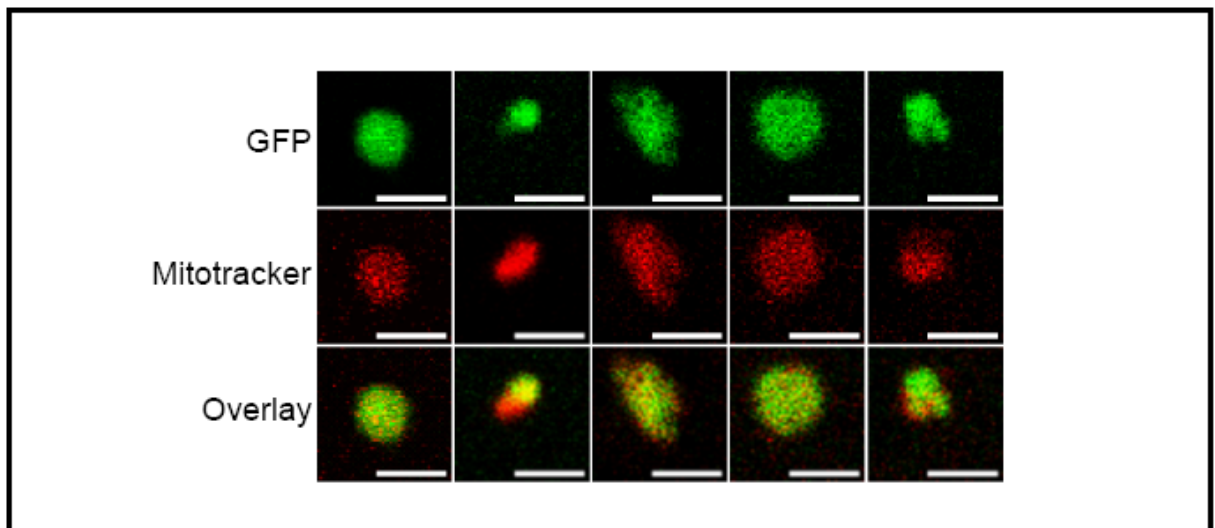


Abbildung 8: Isolierte Mitochondrien aus mit Kesv::GFP transfizierten HEK293-Zellen. Es ist eine deutliche Kolokalisation von GFP (grün) und MitoTracker Red (rot) erkennbar. Die Größenbalken entsprechen 2 μm .

2.6 Der N-Terminus von Kesv enthält ein Mitochondrien-Signal

Um zu überprüfen, ob die im N-Terminus vorhergesagte Signalsequenz von Kesv (Tabelle 4) dafür verantwortlich ist, dass Kesv-Protein in die Mitochondrien zu transportieren, wurde der N-Terminus von Kesv vom Startmethionin bis zum Beginn der ersten Transmembrandomäne, dem Threonin 36, mit GFP fusioniert. Falls der N-Terminus ein Mitochondriensignal enthält, kann dieses Signal dafür verantwortlich gemacht werden, dass das daran fusionierte GFP in die Mitochondrien gebracht wird. Als Kontrolle wurde freies GFP in den HEK293-Zellen exprimiert. In den Abbildungen 9 wird deutlich, dass der N-Terminus tatsächlich als Mitochondrienimportsignal fungieren kann. Vergleicht man freies GFP und das Konstrukt N-Terminus-Kesv::GFP kann man erkennen, dass freies GFP im Cytosol der Zelle gleichmäßig verteilt auftritt, während N-Terminus-Kesv::GFP deutlich mit MitoTracker Red fluoreszenzmarkierten Mitochondrien kolokalisiert. Dieses Ergebnis wurde auch von den beiden Lokali-

sationsvorhersageprogrammen MitoProt und TargetP 1.1 prognostiziert, die für das N-Terminus-Fusionsprotein ähnliche Wahrscheinlichkeiten berechneten wie für Kesv-wt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Vorhersagen von Mitoprot und TargetP 1.1 für Variationen des Konstrukts N-Terminus(Kesv)-GFP und Kesv::GFP. [Wahrscheinlichkeit] des Programms TargetP 1.1 für das Vorhandensein eines mitochondrialen Signalpeptids (mTP), eines Signals für den sekretorischen Weg (SP) und für andere Signale (andere).

Konstrukte	MitoProt	TargetP 1.1			Lokalisation im Experiment
		mTP	SP	Andere	
Kesv-wt	0.83	0.63	0.70	0.01	Mitochondrien
Freies GFP	0.07	0.03	0.55	0.76	Cytosol
N-Terminus Kesv::GFP	0.80	0.57	0.69	0.01	Mitochondrien
N-Terminus Kesv::GFP_R3E+R4E	0.20	0.07	0.59	0.38	Cytosol

Aus der Literatur ist bekannt, dass mitochondriale Signalpeptide meist eine Reihe von positiven Ladungen (Arginin und Lysin) sowie hydrophobe helicale Bereiche enthalten können (von Heijne, 1986; Schatz, 1987; Schwarz und Neupert, 1994; Lithgow, 2000). Meist sind diese Aminosäuren so angeordnet, dass eine amphipatische Struktur entsteht, d.h. die geladenen Aminosäuren und die hydrophoben Aminosäuren in einander gegenüberliegenden Bereichen gelegen sind. Diese besondere Anordnung ermöglicht es bestimmten Proteinen des Translokationsapparats, spezifisch an das Signalpeptid zu binden und das Protein an seinen Bestimmungsort zu transportieren.

Die erwähnten Aminosäuren sowie die Helixstruktur findet man auch im N-Terminus von Kesv. Zu den positiven Aminosäuren gehören R3, R4, R16 und K25. Aus diesem Grund wurden im Fusionsprotein N-Terminus-Kesv::GFP die ersten beiden Arginine an den Positionen drei und vier jeweils gegen die negative geladene Glutamate ausgetauscht (N-Terminus-Kesv::GFP_R3E+R4E). Erwartet wurde, dass es dadurch zu einer Veränderung im *targeting* kommt und das Fusionsprotein somit nicht mehr in die Mitochondrien transportiert werden kann. Betrachtet man die Vorhersage für die Sortierung dieser Mutation, so ergibt sich, dass diese beiden Positionen eine wichtige Rolle für die Eigenschaft des Signalpeptids spielen; die vorhergesagte Lokalisation weicht erheblich von der für Kesv::GFP und N-Terminus-Kesv::GFP ab (siehe Tabelle 5). Bei der Prüfung dieser Mutation im Experiment ist deutlich der Verlust an strukturierter Verteilung der GFP-Fluoreszenz innerhalb der Zelle zu erkennen:

Das mutierte Fusionsprotein ist ähnlich wie freies GFP gleichmäßig im Cytosol verteilt. Diese Befunde weisen darauf hin, dass der N-Terminus ein mitochondriales *targeting*-Signal enthält, welches dazu in der Lage ist, ein normalerweise im Cytosol lokalisiertes Protein, in diesem Fall GFP, in die Mitochondrien umzuleiten.

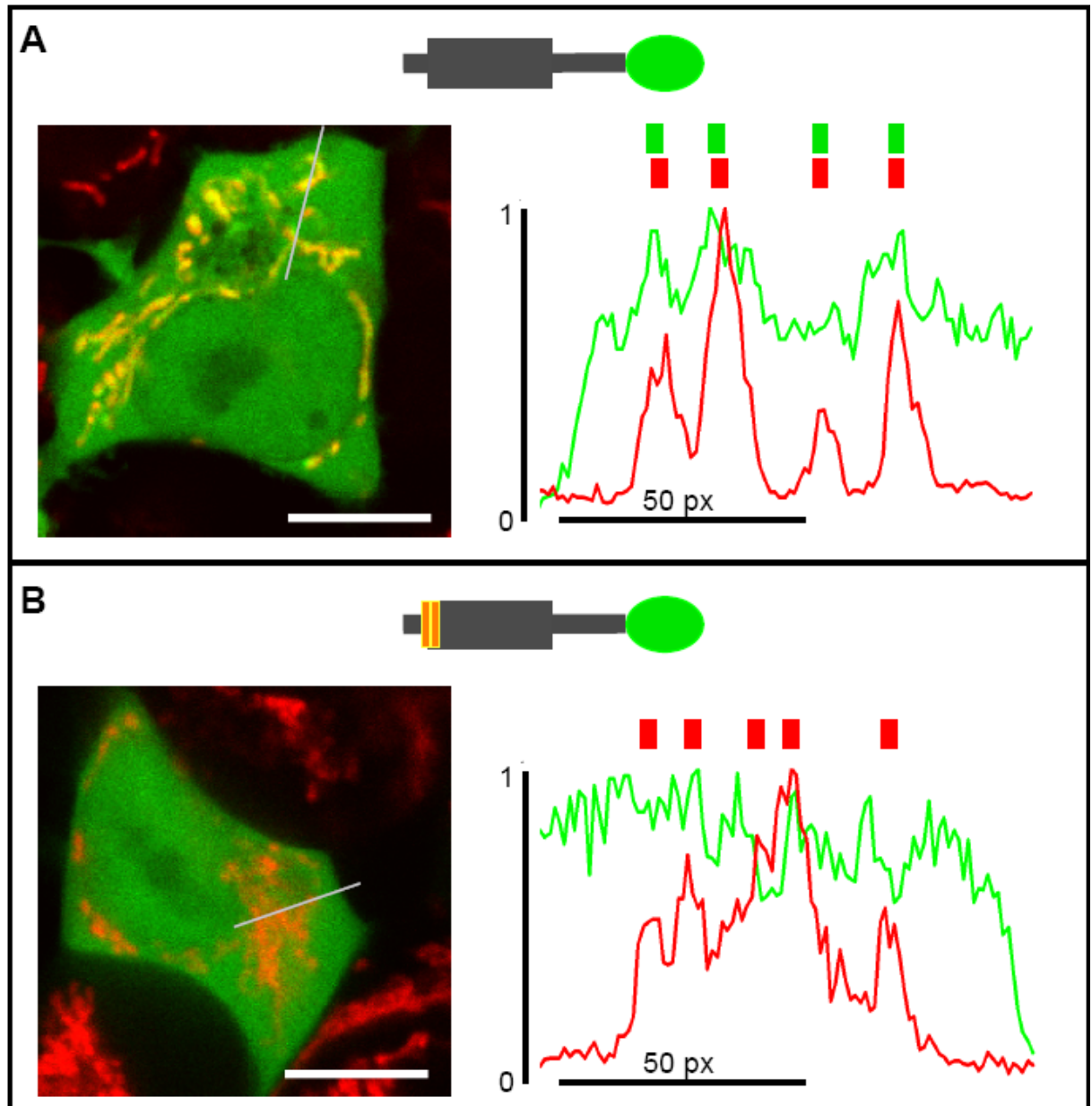


Abbildung 9: Der N-Terminus von Kesv trägt eine Mitochondriensignalsequenz; CLSM-Aufnahmen zeigen mit MitoTracker Red angefärbte und mit den Konstrukten N-Terminus-(Kesv)::GFP (A) und N-Terminus Kesv::GFP_R3E+R4E (B) transfizierte HEK293-Zellen (die Positionen der Mutationen sind im Schema orangefarbenen markiert). Für beide Aufnahmen wurde entlang der grauen Linie ein Profilplot mit normierten Intensitäten für grüne und rote Pixel erstellt. Grüne und rote Rechtecke verdeutlichen hohe Fluoreszenzintensitätswerte. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Ob dieses Motiv auch maßgeblich für die mitochondriale Verteilung von Kesv::GFP verantwortlich ist, wurde, durch die schon oben durchgeführten Mutation (R3E und R4E) im Kesv::GFP Konstrukt, überprüft. Wie im vorhergehenden Beispiel veränderte sich auch in diesem Fall die Vorhersagewerte (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Vorhersagen mit MitoProt II und TargetP und die experimentellen Befunde für die Mutationen im N-Terminus.

Konstrukte	MitoProt II	TargetP 1.1			Lokalisation im Experiment
		mTP	SP	Andere	
Kesv-wt	0.83	0.63	0.70	0.01	Mitochondrien
Kesv_R3E+R4E	0.23	0.09	0.60	0.30	Mitochondrien
Kesv_R16E	0.67	0.14	0.87	0.03	Mitochondrien
Kesv_R16S	0.48	0.30	0.89	0.01	Mitochondrien
Kesv_K25E	0.78	0.40	0.79	0.01	Mitochondrien
Kesv_R3E+R4E+R16E	0.10	0.04	0.82	0.21	Mitochondrien
Kesv_R3E+R4E+R16S	0.06	0.04	0.88	0.13	Mitochondrien

Allerdings hatte die Mutation hier, im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment, keine Veränderung der mitochondrialen Lokalisation von Kesv::GFP zur Folge (Abbildung 10B). Da innerhalb des N-Terminus noch weitere positive Aminosäuren enthalten sind, wurden zusätzliche Einzel- oder Mehrfachmutationen dieser Aminosäuren erstellt, um zu überprüfen, ob diese Auswirkungen auf die Lokalisation von Kesv::GFP haben. In Tabelle 6 sind alle erstellten Konstrukte inklusive der vorhergesagten sowie der experimentell bestimmten Lokalisation aufgeführt. Sämtliche hergestellten Konstrukte konnten in den Mitochondrien nachgewiesen werden, obwohl in den meisten Fällen eine andere Lokalisation vorhergesagt wurde. Exemplarisch für alle Mutation zeigt Abbildung 10A eine mit der Dreifachmutation R3E+R4E+R16E im N-Terminus von Kesv::GFP transfizierte HEK293-Zelle.

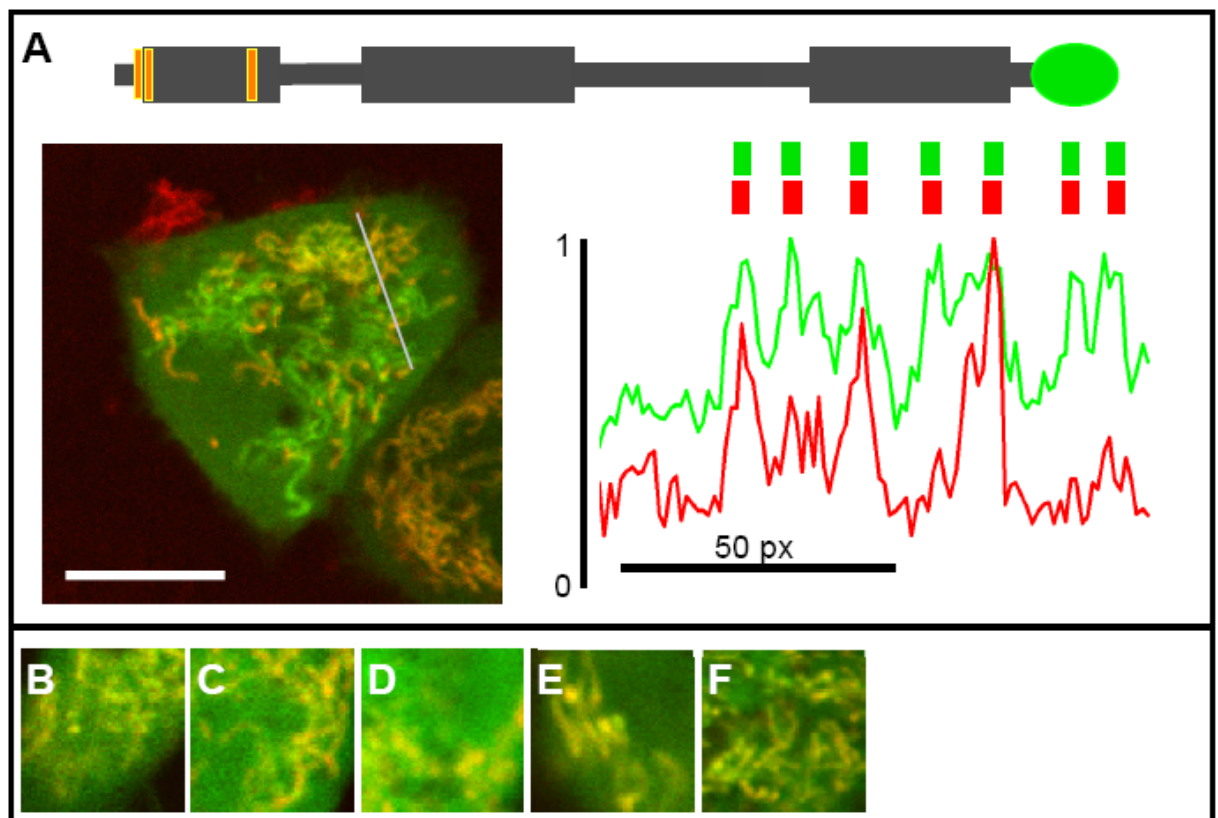


Abbildung 10: Mutationen im N-Terminus von Kcsv haben keinen Einfluss auf die mitochondriale Verteilung. Beispielhaft ist die Aufnahme des Konstrukts Kcsv_R3E+R4E+R16E (die Positionen der Mutationen sind im Schema orangefarbenen markiert) und der dazugehörige Profilplot entlang der grauen Linie mit normierten Intensitäten für grüne (GFP) und rote (MitoTracker Red) Pixel gezeigt (A). Grüne und rote Rechtecke verdeutlichen hohe Fluoreszenzintensitätswerte. In kleinen Ausschnitten sind die weiteren durchgeführten Mutationen aufgeführt; Kcsv_R3E+R4E (B), Kcsv_R3E+R4E+R16S (C), Kcsv_R16E (D), Kcsv_R16S (E) und Kcsv K25E (F). Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob Kcsv::GFP auch ohne seinen cytoplasmatischen N-Terminus (M1-T36) in der Lage ist, seine mitochondriale Verteilung zu erhalten. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob der N-Terminus von Kcsv nicht nur dazu in der Lage ist, GFP in die Mitochondrien zu leiten, sondern womöglich auch ein anderes Membranprotein. In diesem Fall bot sich erneut Kcv::GFP als ideales Vergleichsprotein an. Um diese beiden Fragen experimentell klären zu können, wurden zwei Chimären hergestellt. Eine der beiden Chimären besteht aus dem N-Terminus Kcv (M1-E12) und dem Kcsv Protein von Beginn der ersten Transmembrandomäne bis zu dessen Ende (S37-K124), die zweite Chimäre dementsprechend aus dem N-Terminus Kcsv (M1-T36) und Kcv (P13-L94). Beide Chimären sind in

Abbildung 11 schematisch dargestellt. Auch für diese Chimären wurden zunächst die Lokalisationvorhersageprogramme angewendet (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Vorhersagen der Algorithmen MitoProt II und TargetP für die Chimären mit ausgetauschten N-Termini und ihrer experimentell ermittelten Lokalisation.

Konstrukte	MitoProt II	TargetP 1.1			Lokalisation im Experiment
		mTP	SP	Andere	
Kesv-wt	0.83	0.63	0.70	0.01	Mitochondrien
Chimäre N-Terminus Kesv	0.78	0.63	0.71	0.01	ER
Chimäre N-Terminus Kcv	0.52	0.02	0.80	0.22	Mitochondrien

Vergleicht man Experiment und Prognose, so weichen in beiden Fällen die Ergebnisse voneinander ab: Die Chimäre, die aus dem N-Terminus von Kcv und ab der TM1 aus Kesv besteht, gelangt trotz des fehlenden N-terminalen Signalpeptids in die Mitochondrien, was infolge der zuvor durchgeführten Experimente nicht ganz überraschend war (Abbildung 11A). Die gegensätzliche Chimäre aus dem N-Terminus Kesv und restlichem Kcv, also mit dem Signalpeptid aus Kesv, zeigt eine Verteilung in der Zelle, wie es für Kcv::GFP üblich ist (Abbildung 11B). Das Signalpeptid aus Kesv ist anscheinend nicht in der Lage, ein anderes Membranprotein, in diesem Fall Kcv, in ein anderes Zellkompartiment umzuleiten.

Auf Grundlage der hier vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der N-Terminus nicht allein für die mitochondriale Verteilung von Kesv::GFP verantwortlich sein kann. Vielmehr zeigen die Befunde, dass noch mindestens ein weiteres Signal in Kesv versteckt sein muss, welches das *targeting* in die Mitochondrien initiiert.

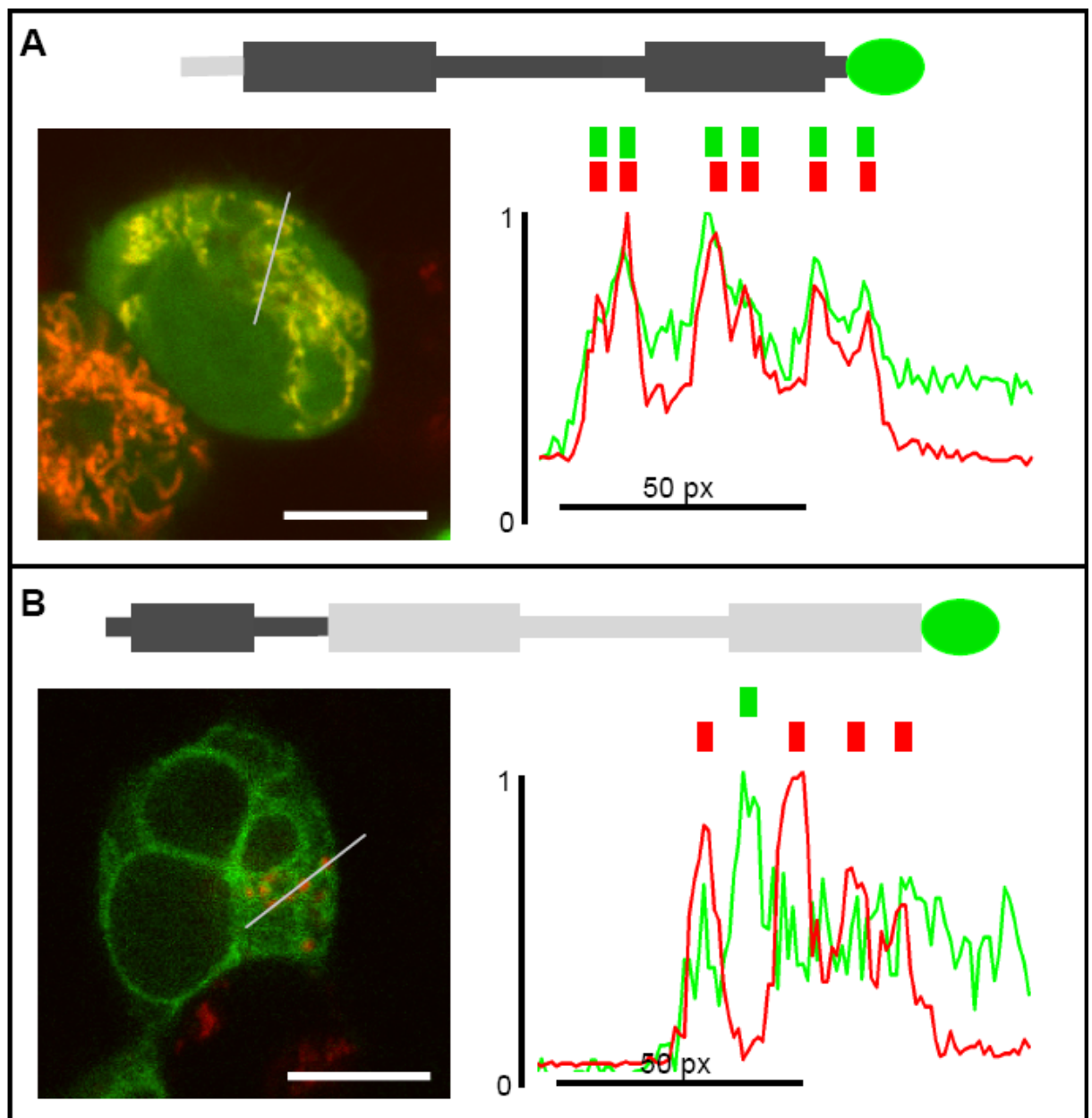


Abbildung 11: Aufnahmen der Chimären mit ausgetauschten N-Termini; in **(A)** die Chimäre aus dem N-Terminus von Kcv und Kesv und in **(B)** die Chimäre aus N-Terminus Kesv und Kcv. Zu beiden Aufnahmen wurden Profilplots entlang der grauen Linien mit normierten Intensitäten für grüne (GFP) und rote (MitoTracker Red) Pixel erstellt. Grüne und rote Rechtecke verdeutlichen hohe Fluoreszenzintensitätswerte. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

2.7 Einfluss der zweiten Transmembrandomäne auf die Lokalisation

Beim Vergleich der Sekundärstruktur von Kcv und Kesv fiel auf, dass die Prognose für die Länge der zweiten Transmembrandomäne neben dem längeren N-Terminus von Kesv den einzigen nennenswerten Unterschied zwischen der Sekundärstruktur der beiden Proteine darstellt. Wie Tabelle 8 entnommen werden kann, werden die zweite Transmembrandomäne von Kesv mit einer Länge von 18 AS und diejenige von Kcv mit einer Länge von 20 AS vorhergesagt.

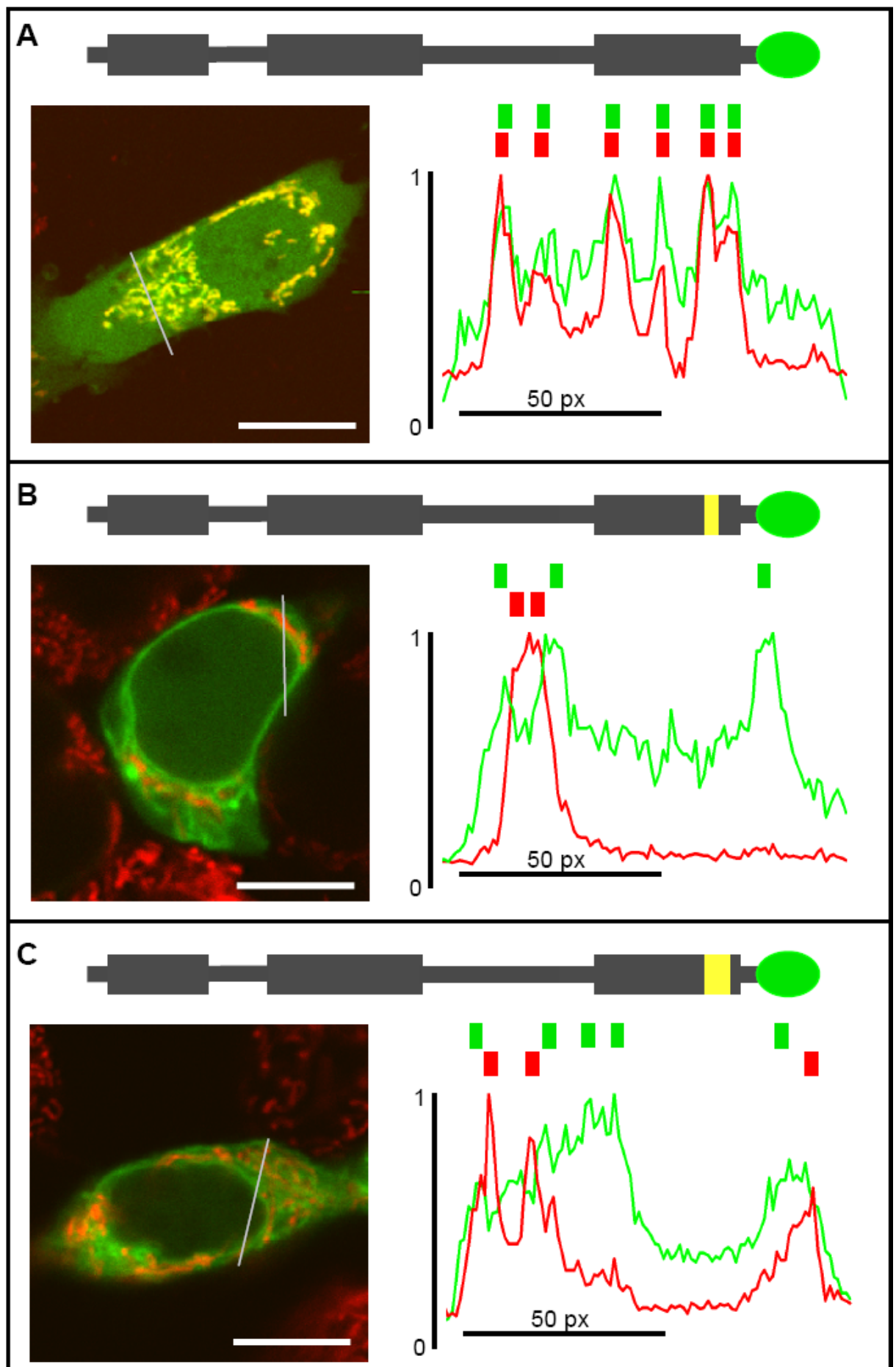
Aus verschiedenen Arbeiten an Protozoa, im Hefesystem, im pflanzlichen sowie im tierischen System (Pedrazzini *et al.*, 1996; Rayner und Pelham, 1997; Brandizzi *et al.*, 2002; Karsten *et al.*, 2004), ist bekannt, dass die Länge einer helicalen Transmembrandomäne entscheidend für die Sortierung eines Proteins sein kann. Daher hatte schon Mehmel (2004) untersucht, ob auch bei Kesv eine Veränderung der Lokalisation durch eine Veränderung der Länge der TM2 erreicht werden kann. Er konnte nachweisen, dass die Insertion von drei (IVL) bzw. sechs (IVLIVL) hydrophoben Aminosäuren in das letzte Drittel der vorhergesagten TM2 (Position 113) eine veränderte Lokalisation zur Folge hatte (Abbildung 12). Während Kesv-wt sich in einem nicht näher beschriebenen Kompartiment befindet, konnten die Mutanten in den gleichen zellulären Strukturen wie Kcv nachgewiesen werden (Mehmel, 2004). Dass die Insertion eine Verlängerung zur Folge hat, konnte durch Zuhilfenahme des TMHMM 2.0 Algorithmus bestätigt werden. Für die Verlängerungsmutanten 113IVL und 113IVLIVL wurde eine Verlängerung der TM2 von 18 auf 23 Aminosäuren vorhergesagt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Transmembranvorhersagen für den Bereich und die Länge der TM2 mit TMHMM 2.0. Die Vorhersage wurde für die Konstrukte ohne GFP bestimmt.

Konstrukte	TMHMM 2.0	
	TM2 von bis	Länge TM2
Kcv wt	73-92	20
Kesv wt	102-119	18
Kesv_113IVL	103-125	23
Kesv_113IVLIVL	102-124	23

Folgende Seite:

Abbildung 12: Verlängerungen der TM2 von Kesv verändern das *targeting*; Aufnahmen von Kesv::GFP (**A**) und den Verlängerungsmutanten Kesv_113IVL (**B**) und Kesv_113IVLIVL (**C**) (Positionen der Verlängerungen sind im Schema gelb gekennzeichnet). Zu den Aufnahmen wurden Profilplots entlang der grauen Linien mit normierten Intensitäten für grüne (GFP) und rote (MitoTracker Red) Pixel erstellt. Grüne und rote Rechtecke verdeutlichen hohe Fluoreszenzintensitätswerte. Der Größenbalken entspricht 10 μm .



2.8 Verlängerung der TM2 mit anderen und einer unterschiedlichen Anzahl von Aminosäuren

Wie bereits mit der Insertion von drei (IVL) und sechs (IVLIVL) Aminosäuren gezeigt wurde, kann durch diese Verlängerung eine Veränderung der Lokalisation erreicht werden (Mehmel, 2004). Um zu überprüfen, ob nicht durch Zufall die gewählte Aminosäuresequenz ein eigenes Signal darstellt, wurde mit dreifach Valin (VVV) eine andere Zusammensetzung der Insertion gewählt. Diese Veränderung sollte der Vorhersage zufolge keinen Einfluss auf die Länge der Transmembrandomäne haben (Tabelle 9).

Tabelle 9: Transmembravorhersagen für den Bereich und die Länge der TM2 mit TMHMM 2.0. Die Vorhersage wurde für die Konstrukte ohne GFP bestimmt.

Konstrukte	TMHMM 2.0	
	TM2 von bis	Länge TM2
Kesv wt	102-119	18
Kesv_113V	101-123	23
Kesv_113VV	102-124	23
Kesv_113VVV	103-125	23

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, konnte bei der Expression dieser Mutante das gleiche Verteilungsmuster wie im Falle des Aminosäuremusters IVL beobachtet werden. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich allerdings, dass durch die Insertion von sechs Aminosäuren in der TM2 im Vergleich mit drei zusätzlichen Aminosäuren eine augenscheinlich klarere Verteilung im sekretorischen Weg erreicht wurde. Daher wurde im Anschluss getestet, wie viele zusätzliche Aminosäuren nötig sind, um Kesv in ein anderes Kompartiment umzuleiten. Für die beiden Mutanten Kesv 113VV und 113V wurden ebenfalls Längen von 23 Aminosäuren für die TM2 erwartet. Auf den CLSM-Bildern (Abbildung 13) konnte für beide Mutanten gezeigt werden, dass der veränderte Kesv nicht in den Mitochondrien, sondern im sekretorischen Weg lokalisiert ist. Unterschiede zeigen sich in der Intensität bzw. Deutlichkeit des Fluoreszenzsignals. Während die längste Insertion mit sechs Aminosäuren eine sehr deutliche Ausprägung des perinukleären Rings und des ER zeigt, nimmt diese Deutlichkeit besonders bei der kürzesten Variante ab.

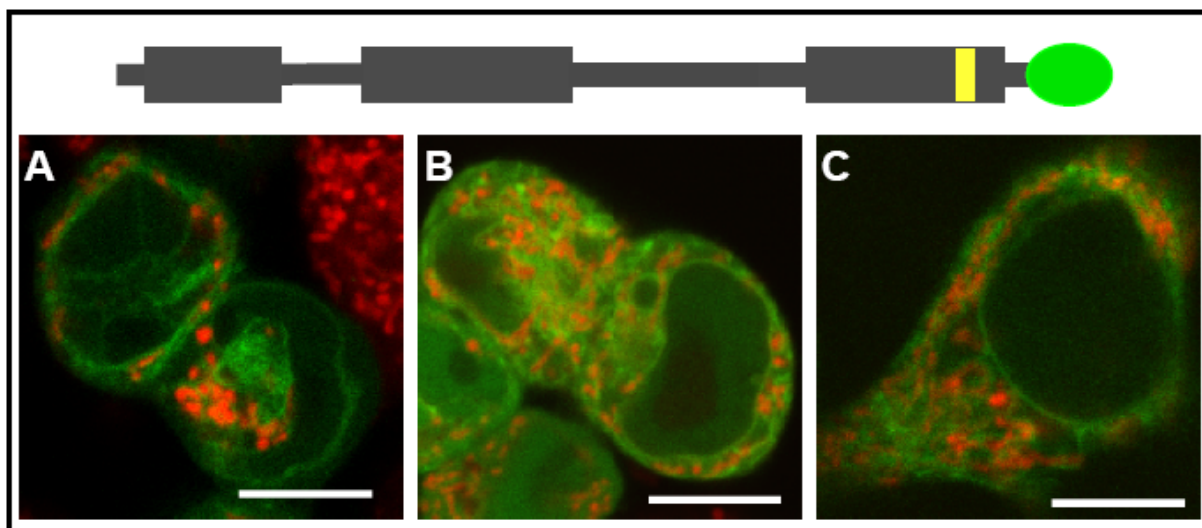


Abbildung 13: Die Insertion von nur einer Aminosäure an Position 113 sortiert Kcsv in den sekretorischen Weg. Gezeigt sind CLSM-Aufnahmen der Kcsv-TM2-Verlängerungen an Positionen 113 mit einem (A), zwei (B) und drei (C) inserierten Valinen exprimiert in MitoTracker Red inkubierten HEK293-Zellen (die Position der Insertionen ist gelb markiert). Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

2.9 Ist die Position der Insertion in der TM2 entscheidend

Die Position 113 wurde rein zufällig als Insertionspunkt ausgewählt. Es wurde lediglich darauf geachtet, dass die Position etwa im letzten Drittel der TM2 liegt, weil das Motiv IVL aus Kcsv auch gegen Ende der TM2 zu finden ist. Um ausschließen zu können, dass im Bereich der Position 113 ein wichtiges Sortierungsmerkmal enthalten ist, welches durch das Einfügen einer variablen Anzahl von Aminosäuren beeinflusst wird, wurde eine Insertion von drei Aminosäuren (IVL) an drei weiteren Stellen, der Position 115 in Richtung C-Terminus und den Positionen 110 und 108 in Richtung N-Terminus, wiederholt. Die Vorhersagen für die Länge und den Bereich der TM2 sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Transmembranvorhersagen für den Bereich und die Länge der TM2 mit TMHMM 2.0. Die Vorhersage wurde für die Konstrukte ohne GFP bestimmt.

Konstrukte	TMHMM 2.0	
	TM2 von bis	Länge TM2
Kesv wt	102-119	18
Kesv_108IVL	103-125	23
Kesv_110IVL	103-125	23
Kesv_113IVL	103-125	23
Kesv_115IVL	103-125	23

Demnach macht es keinen Unterschied an welcher Position eine Verlängerung eingeführt wird, da in allen Fällen die gleiche Länge erwartet wird. Für die Insertion an Position 115 konnte, wie zuvor für alle anderen, eine veränderte Lokalisation im sekretorischen Weg gezeigt werden. Bei den Mutanten mit der Insertion vor Position 113 (108 und 110) konnte keine Veränderung des mitochondrialen *targeting* beobachtet werden (Abbildung 14A und B).

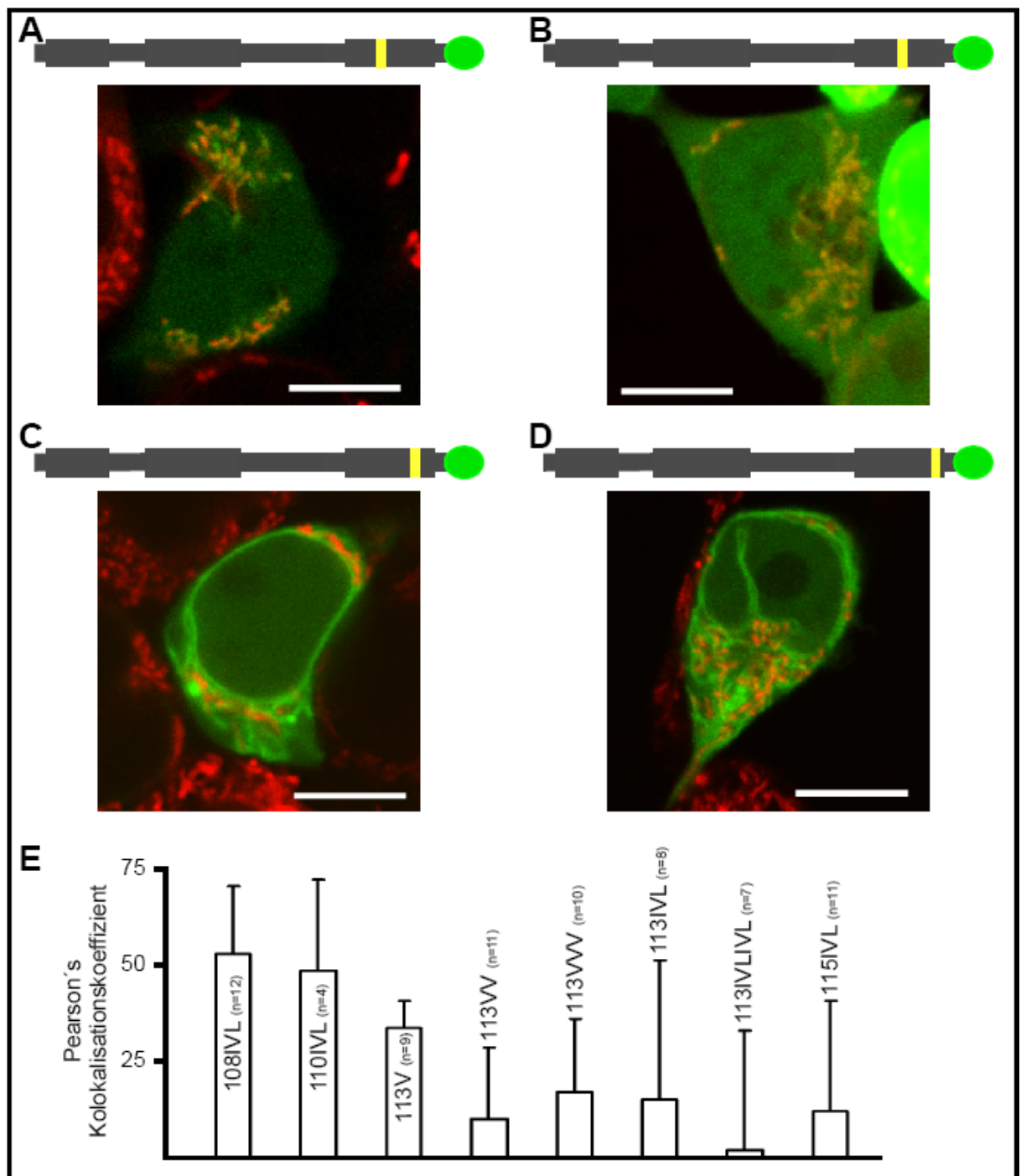


Abbildung 14: Die Positionen der Verlängerungen in der TM2 von Ksv haben einen Einfluss auf die Lokalisation. Gezeigt sind CLSM-Aufnahmen der Ksv-TM2-Verlängerungen an den Positionen 108IVL (A), 110IVL (B), 113IVL (C) und 115IVL (D) exprimiert in MitoTracker Red inkubierten HEK293-Zellen (die Positionen der Insertionen sind gelb markiert). Die Größenbalken entsprechen 10 μm . In (E) sind die Pearson's Kolokalisationskoeffizienten sämtlicher Verlängerungen in der TM2 von Ksv aufgetragen (berechnet mit dem ImageJ-plugin „colocalization threshold“).

2.10 Vergleich der vorhergesagten TM2 zwischen Kcv und Kesv

Die zweite Transmembrandomäne scheint eine wichtige Bedeutung für die Sortierung des Proteins zu haben: Schon eine Insertion von lediglich einer Aminosäure führt zu einer kompletten Veränderung der Verteilung innerhalb Zelle.

Aufgrund dieser so offensichtlich wichtigen Rolle der TM2 bei der Sortierung der Proteine war es an der Zeit, diese Region genauer unter die Lupe zu nehmen. Wie zuvor bereits ausgeführt wurde, sind sich Kcv und Kesv insbesondere im Abschnitt nach der Filterregion bis zum C-Terminus in Bezug auf die Zusammensetzung der Aminosäuren sehr ähnlich. Nimmt man ein Alignment der beiden Kanäle allein in diesem Bereich, so ergibt sich ein prozentualer Anteil an identischen Aminosäuren von 47 %, was verglichen mit 26 % im Gesamtprotein ein erheblich höherer Wert ist. Der Anteil homologer Aminosäuren steigt ebenfalls von 51 % im Gesamtprotein auf 74 % in diesem konkreten Abschnitt. Im Alignment in Abbildung 15 wird augenscheinlich, dass lediglich fünf Aminosäuren im unterlegten TM2-Bereich weder identisch noch homolog sind. Es handelt sich dabei um die Aminosäuren P97, K98, L102, A109 und P116 in Kesv.

Kesv-wt	91	D	L	L	P	K	T	E	K	A	K	L	I	T	I	A	H	I	L	A	M	F	F	V	M	L	P	V	V	A	K	A	L	E	K	124	
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Kcv-wt	68	D	I	L	P	K	T	I	G	A	K	L	T	I	A	H	I	V	T	V	F	F	I	V	L	T	L									94	

Abbildung 15: Alignment des Bereiches um die TM2; hervorgehoben sind identische und sehr ähnliche (*) und homologe (-) Aminosäuren. Die übrigen fünf Aminosäuren (P97, K98, L102, A109 und P116) sind rot umrandet.

Da der Bereich der TM2 nachgewiesenermaßen einen großen Beitrag zur Lokalisation des Proteins leistet, könnte durch einen einzelnen oder mehrfachen Austausch der Aminosäuren an den erwähnten Positionen gegen die in Kcv vorzufindenden Aminosäuren eventuell eine Veränderung der Lokalisation erreicht werden.

Tabelle 11 enthält die Vorhersagen für die TM2-Längen der Mutanten. Abhängig von der Anzahl der Mutationen und der Position werden unterschiedliche Bereiche und Längen vorhergesagt. Die Expression sämtlicher Konstrukte in Zellen zeigte, dass in allen Fällen, gleichgültig ob eine Einfach- oder Mehrfach-Mutation aller fünf Aminosäuren vorlag, keine Veränderung der Lokalisation beobachtet werden konnte. Abbildung 16A zeigt beispielhaft eine

transfizierte HEK293-Zelle mit allen fünf ausgewählten Aminosäuren; für die übrigen Mutationen sind lediglich Vergrößerungen einzelner Zellabschnitte abgebildet (Abbildung 16B bis F).

Durch die Mutationen der fünf nicht homologen Aminosäuren konnte das *targeting* von Kesv nicht verändert werden. Diese Positionen im Allgemeinen bzw. die Aminosäuren im Speziellen scheinen also keinen Einfluss auf die Sortierung zu haben. Deshalb könnte es sich um ein größeres, d.h. ein aus diesem kompletten Bereich zusammengesetztes Signal handeln.

Tabelle 11: Transmembranvorhersagen für verschiedene Mutation in der TM2 von Kesv mit TMHMM 2.0. Die Vorhersage wurde für die Konstrukte ohne GFP bestimmt.

Konstrukte	TMHMM 2.0	
	TM2 von bis	Länge TM2
Kesv wt	102-119	18
Kesv_P97T+K98G	97-119	23
Kesv_L102C	103-122	20
Kesv_L102C+P116T	103-122	20
Kesv_P116T	102-119	18
Kesv_P97T+K98G+L102C+P116T	97-119	23
Kesv_P97T+K98G+L102C+A109T+P116T	97-119	23

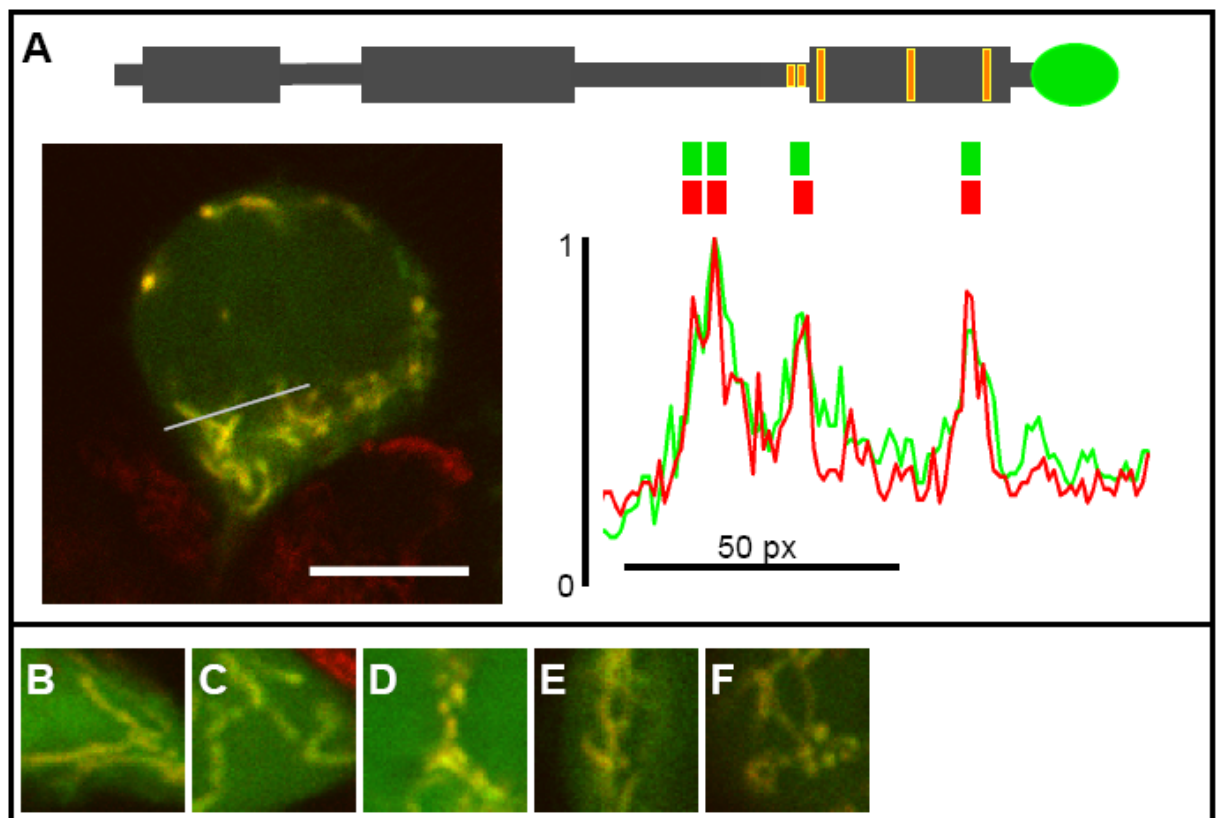


Abbildung 16: Mutationen in der TM2 haben keinen Einfluss auf die mitochondriale Verteilung von Kesv. Beispielhaft für alle Mutationen ist die CLSM-Aufnahme des Konstrukts Kesv_P97T+K98G+L102C+A109T+P116T (die Positionen der Mutationen sind im Schema orangefarbenen markiert) und der dazugehörige Profilplot entlang der grauen Linie mit normierten Intensitäten für grüne (GFP) und rote (MitoTracker Red) Pixel dargestellt. Grüne und rote Rechtecke kennzeichnen hohe Fluoreszenzenintensitätswerte (A). In kleinen Ausschnitten sind weitere Mutationen aufgeführt; Kesv_P97T+K98G (B), Kesv_L102C (C), Kesv_L102C+P116T (D), Kesv_P97T+K98G+L102C+P116T (E) und Kesv_P116T (F). Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

2.11 Ist die zweite Transmembrandomäne entscheidend für die unterschiedliche Sortierung?

Im vorigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass der Austausch nicht homologer Aminosäuren im Bereich der TM2 von Kesv keine Auswirkung auf die Lokalisation der Mutanten hat. Um den Einfluss dieser Region auf das *targeting* genauer zu untersuchen, wurden Chimären bei der Proteine hergestellt, bei denen die Abschnitte hinter der Filterregion gegeneinander ausgetauscht wurden. Der Selektivitätsfilter wurde deshalb als Fixpunkt des Austausches gewählt, weil er in sämtlichen bekannten Kaliumkanälen konserviert ist und da durch Transmembran-

vorhersagen lediglich wahrscheinliche Bereiche für Transmembrandomänen bestimmt werden können. In Kcv wurde nach der Position D68 und in Kesv nach Position D91 die C-terminalen Proteinabschnitte ausgetauscht.

Die Ergebnisse der Expression der beiden Chimären waren überraschend. Da die Vermutung bestand, dass der Bereich der TM2 für die Sortierung zumindest mit- oder sogar hauptverantwortlich sein könnte, wurde erwartet, dass der Tausch der C-terminalen Proteinabschnitte von Kcv und Kesv eine Veränderung in der Lokalisation herbeiführen würde – und zwar dergestalt, dass Kcv mit dem C-terminalen Bereich von Kesv (Chimäre TM2(Kesv)) in den Mitochondrien und Kesv mit dem entsprechenden C-terminalen Bereich von Kcv (Chimäre TM2(Kcv)) im sekretorischen Weg aufzufinden wäre. Aufgrund der Vorhersagen mit Mitoprot II und TargetP war eine Lokalisation der Chimäre TM2(Kesv) im sekretorischen Weg zu erwarten (Tabelle 12). Diese Vorhersage bestätigte sich, obwohl aufgrund der vorangegangenen Experimente nicht unbedingt damit gerechnet werden konnte (Abbildung 17). Die zweite Chimäre, Kesv mit C-terminalem Abschnitt von Kcv, zeigte trotz der längeren TM2 von Kcv und einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisation sogar nur eine cytosolische Verteilung.

Tabelle 12: Vorhersage der Lokalisation der Chimären mit ausgetauschten C-terminalen Proteinabschnitten (TM2) unter Verwendung von Mitoprot II und TargetP.

Konstrukte	MitoProt II	TargetP 1.1			Lokalisation im Experiment
		mTP	SP	Andere	
Kesv-wt	0.83	0.63	0.70	0.01	Mitochondrien
Chimäre TM2 Kesv	0.21	0.03	0.90	0.09	ER
Chimäre TM2 Kcv	0.78	0.63	0.71	0.01	Cytosol

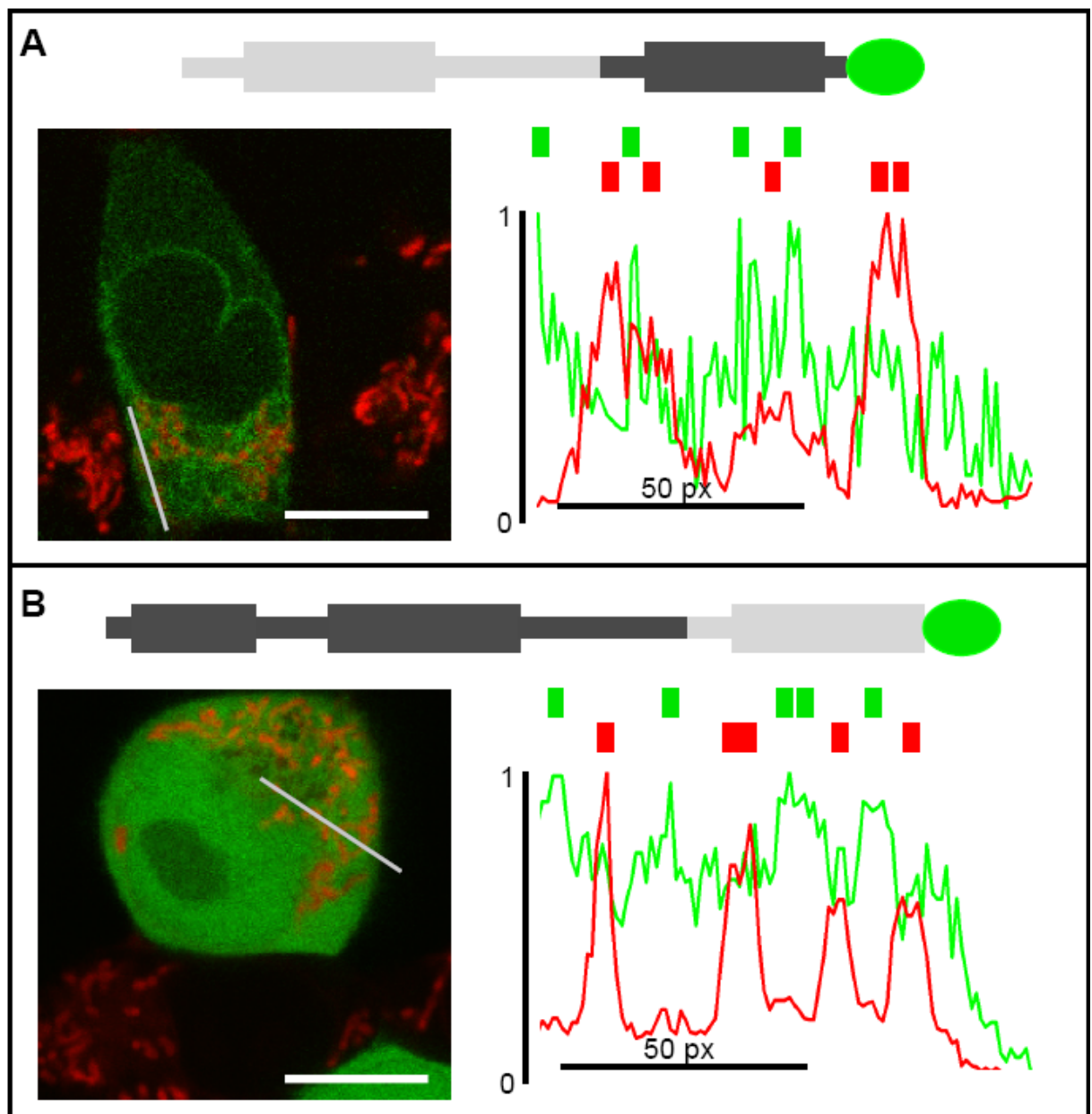


Abbildung 17: Der Austausch der C-terminalen Region ab dem Selektivitätsfilter hat Einfluss auf die Sortierung. CLSM-Aufnahmen der Chimären mit getauschter TM2 exprimiert in MitoTracker Red inkubierten HEK293-Zellen. (A) zeigt die Chimäre bestehend aus N-terminalem Bereich von Kcv und C-terminalem von Kesv und (B) die inverse Chimäre. Neben den Aufnahmen sind Profilplots entlang der grauen Linien mit normierten Intensitäten für grüne (GFP) und rote (MitoTracker Red) Pixel dargestellt. Grüne und rote Rechtecke kennzeichnen hohe Fluoreszenzenintensitätswerte. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

2.12 Chimären mit einer veränderten ersten Transmembrandomäne zeigen ein unterschiedliches *targeting*

Da die Chimäre aus Kcv mit dem C-terminalen Bereich von Kesv (Chimäre TM2(Kesv)) keine Sortierung in die Mitochondrien verursachte, wurde überprüft, welche weiteren Abschnitte von Kesv nötig sind, um eine mitochondriale Verteilung zu erreichen. Dazu wurde zunächst bei der Chimäre TM2(Kesv) auch noch der N-Terminus ausgetauscht; die resultierende Chimäre bestand, also wie in Abbildung 19A zu sehen ist, aus dem N-Terminus und der C-terminalen Region von Kesv sowie Anfang der TM1 bis zum Selektivitätsfilters aus Kcv (Chimäre TM1 3/3 Kcv). Wie die Aufnahmen der transfizierten HEK293-Zellen zeigen, ist die gleiche deutliche Verteilung im sekretorischen Weg auszumachen, wie sie zuvor auch bei der Chimäre TM2(Kesv) beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis ist deshalb so erstaunlich, da diese Chimäre sowohl den N-Terminus von Kesv, der alleine genommen als Mitochondriensignal ausreicht, als auch die TM2 von Kesv, das zweite wichtige Sortierungssignal enthält. . Auf Basis der vorherigen Ergebnisse wäre zu erwarten gewesen, dass die Kombination dieser beiden wichtigen Bereiche zu einem *targeting* in die Mitochondrien hätte führen sollen.

Da diese Chimäre jedoch keine mitochondriale Lokalisation zeigte, sollte in den folgenden Experimenten der Kesv-Anteil an dieser Chimäre vom N-Terminus stromabwärts stetig erhöht werden, um so irgendwann die kritische Grenze zu erreichen, an der das Konstrukt in den Mitochondrien lokalisiert.

Somit musste auf den Austausch des N-Terminus die Auswechslung der TM1-Domäne folgen. Diese wird sowohl für Kesv als auch Kcv mit einer Länge von 23 Aminosäuren vorhergesagt. Dies geschah durch einen Austausch ganzer Aminosäureabschnitte. Dazu wurde die TM1 in drei etwa gleich große Bereiche aufgeteilt. Im ersten Schritt wurden in der Chimäre TM1 3/3 Kcv sieben Aminosäuren aus der TM1 von Kcv gegen die gleiche Anzahl Aminosäuren aus der TM1 von Kesv ausgetauscht. In den folgenden beiden Schritten wurden dann jeweils acht weitere Aminosäuren der TM1 von Kesv angeglichen. Schemata der resultierenden Chimären sind in Abbildung 19B-D gezeigt. Vorhersagen mit TMHMM 2.0 gaben bei allen Chimären die Länge der TM1 mit 23 Aminosäuren an. Alleine die Vorhersagen für die TM2 variierten von 18-23 Aminosäuren (Tabelle 13 und Abbildung 18). Um die Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung der TM1 in den Chimären anschaulich darzustellen wurde ein Alignment von Kesv, Kcv und Chimären erstellt, das in Abbildung 18 zu sehen.

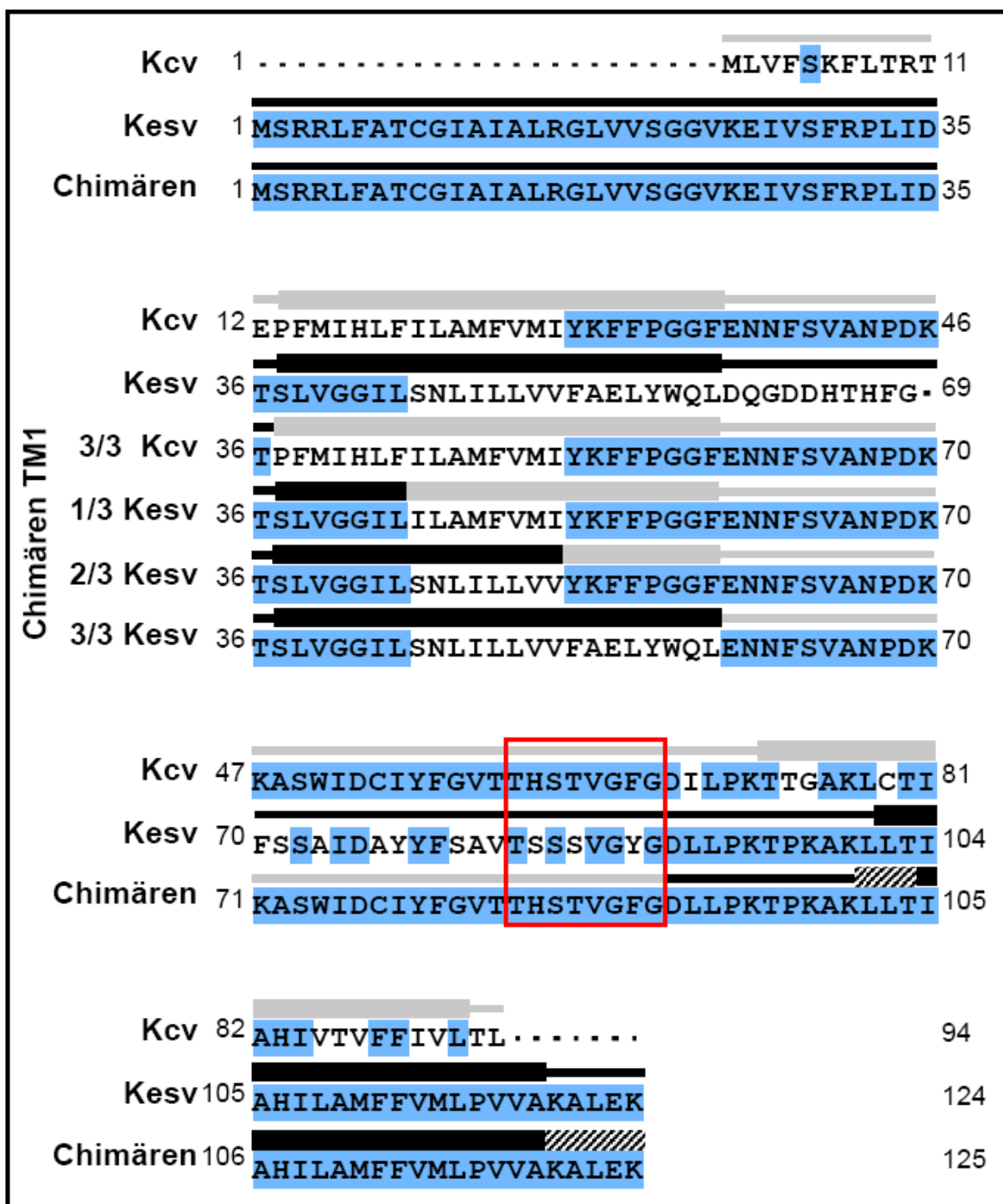


Abbildung 18: Alignment von Kcv, Kesv und den TM1-Chimären. Blau unterlegte Aminosäuren sind innerhalb des Alignments stark konserviert. Hervorgehoben sind die Transmembranvorhersagen aus Tabelle 13 (hellgrau = Kcv; schwarz = Kesv, schraffiert = variable Abschnitte in der TM2-Vorhersage der Chimären). Die konservierte Filterregion ist rot umrandet.

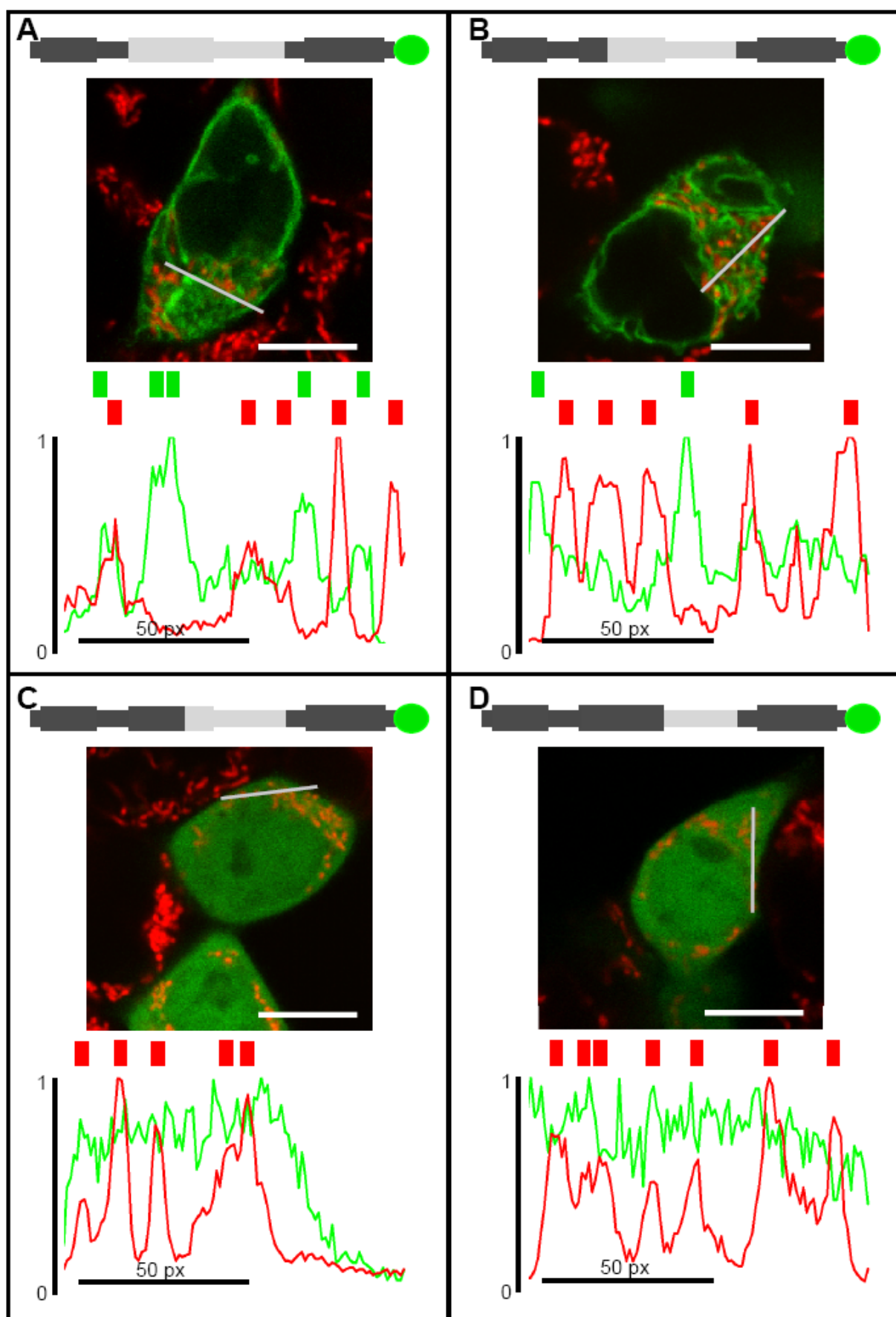
Tabelle 13: Transmembranvorhersagen für den Bereich und die Länge der TM1 und TM2 mit TMHMM 2.0. Die Vorhersage wurde für die Konstrukte ohne GFP bestimmt.

Konstrukte	TMHMM 2.0			
	TM1 von bis	Länge TM1	TM2 von bis	Länge TM2
Kcv wt	13-35	23	73-92	20
Kesv wt	37-59	23	102-119	18
Chimäre TM1 3/3 Kcv	37-59	23	104-123	20
Chimäre TM1 1/3 Kesv	37-59	23	102-124	23
Chimäre TM1 2/3 Kesv	37-59	23	103-125	23
Chimäre TM1 3/3 Kesv	37-59	23	103-120	18

Die Resultate der Expression der Chimären sind in Abbildung 19B-D dargestellt. Die Chimäre, bei der die TM1 den ersten sieben Aminosäuren der TM1 von Kesv angeglichen wurde, war noch immer im sekretorischen Weg lokalisiert. Die weiteren Chimären bei denen 15 bzw. alle 23 Aminosäuren der TM1 von Kesv vorhanden waren, waren nur im Cytosol der Zelle aufzufinden. Es scheint so, als ob sie jegliches Sortierungssignal verloren hätten und daher weder in das ER noch in die Mitochondrien sortiert wurden (Abbildung 19C,D). Die Zusammensetzung der TM1 in der Chimäre ist ab dem zweiten eingeführten Drittel von Kesv anscheinend derart verändert, dass eine Sortierung in den sekretorischen Weg nicht mehr möglich ist. Aber auch eine Sortierung in die Mitochondrien scheint durch einen größeren Anteil von Kesv an der Chimäre nicht möglich. Es scheint also, als ob auch der Bereich nach der TM1 benötigt wird, um ein mitochondriales *targeting* zu ermöglichen.

Folgende Seite:

Abbildung 19: Chimären mit Veränderungen in der TM1 sind unterschiedlich lokalisiert. Schemata (hellgrau = Kcv; dunkelgrau = Kesv) und CLSM-Aufnahmen der Chimären mit veränderter TM1 exprimiert in MitoTracker Red inkubierten HEK293-Zellen. **(A)** zeigt ein Overlay der Chimäre TM1 3/3 Kcv, **(B)** der Chimäre TM1 1/3 Kesv, **(C)** der Chimäre TM1 2/3 Kesv und **(D)** der Chimäre TM1 3/3 Kesv. Unterhalb der Aufnahmen sind Profilplots entlang der grauen Linien mit normierten Intensitäten für grüne (GFP) und rote (MitoTracker Red) Pixel dargestellt. Grüne (GFP) und rote (MitoTracker Red) Rechtecke kennzeichnen hohe Fluoreszenzenintensitätswerte. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.



2.13 Untersuchungen zum Kev-Transportweg in die Mitochondrien

In weiteren Versuchen wurde untersucht an welcher Stelle im Syntheseweg und über welchen Mechanismus die beiden sehr ähnlichen Kaliumkanäle Kev und Kev zu unterschiedlichen Zielmembranen sortiert werden. Bislang wurde die Meinung vertreten, dass Mitochondrien- und auch Chloroplastenproteine an freien Ribosomen translatiert werden und dann über das Cytosol zu ihren Zielorganellen gelangen, wo sie von den jeweiligen Translokationsmaschinen inseriert werden. Durch Untersuchungen von Villarejo *et al.* (2005) konnte jedoch gezeigt werden, dass das Chloroplastenprotein CAH1 nicht den zuvor beschriebenen Weg geht, sondern teilweise über den sekretorischen Weg transportiert wird. Das Protein wird demnach über das ER, zum Golgi-Apparat, in dem es glykosiliert wird, und von dort mittels Vesikeltransport zu den Chloroplasten geleitet, wo es mit Hilfe eines zu TOC und TIC, alternativen Transportweges, der noch nicht aufgeklärt ist, über die Chloroplastenmembranen importiert wird. Da die Importwege von Chloroplasten und Mitochondrien sehr ähnlich sind, wurde untersucht, ob der Transport von Kev zu den Mitochondrien vielleicht auf eine ähnliche Art und Weise verläuft.

Überprüft wurde deshalb, ob Kev nach der Translation zunächst ins ER inseriert und erst dort entschieden wird, welches Kompartiment das eigentliche Ziel von Kev ist. In Anlehnung an die Experimente von Villarejo *et al.* (2005), die zeigen konnten, dass durch C-terminales Anfügen des Retentionssignals KDEL an das Konstrukt CAH1::GFP, das Fusionsprotein nicht mehr in den Chloroplasten sondern im ER lokalisiert war, wurde das ER-Retentionssignal KDEL C-terminal an das Kev-GFP-Fusionsprotein angefügt. CLSM-Aufnahmen zeigen, dass dieses Retentionssignal keine Auswirkung auf die Lokalisation von Kev hatte, der nach wie vor in den Mitochondrien zu finden war (Abbildung 20B). Dies deutet daraufhin, dass Kev nicht ins ER eingebaut wird oder das Retentionssignal hier keine Wirkung zeigt.

Für den Fall der Wirkungslosigkeit des Retentionssignals wurde ein weiteres Experiment von Villarejo *et al.* (2005) zur Untersuchung des weiteren Transportweges durchgeführt. In der zitierten Arbeit wurden Zellen, die das Protein CAH1::GFP exprimieren, mit Brefeldin A, das den Vesikeltransport abgehend vom Golgi-Apparat inhibiert, inkubiert. Dadurch konnten die Autoren zeigen, dass CAH1::GFP auf seinem Weg in die Chloroplasten den Golgi-Apparat passiert, da durch die Inhibierung des Vesikeltransports nur im Golgi-Apparat und nicht in den Chloroplasten eine GFP-Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Ein möglicher Transport über den Golgi-Apparat wurde auch für Kev::GFP überprüft. Dazu

wurden die transfizierten Zellen 24 h nach der Transfektion für 4 h mit Brefeldin A und Cycloheximid, das die Proteintranslation unterbindet, inkubiert. Wie schon anhand des vorherigen Experiments erwarten werden konnte, hatte die Inhibierung des Vesikeltransports am Golgi-Apparat keine Auswirkung auf die mitochondriale Lokalisation von Kesv::GFP (Abbildung 20A). Anhand der beiden Experimente kann ausgeschlossen werden, dass Kesv auf seinem Weg in die Mitochondrien weder das ER oder den Golgi-Apparat passiert.

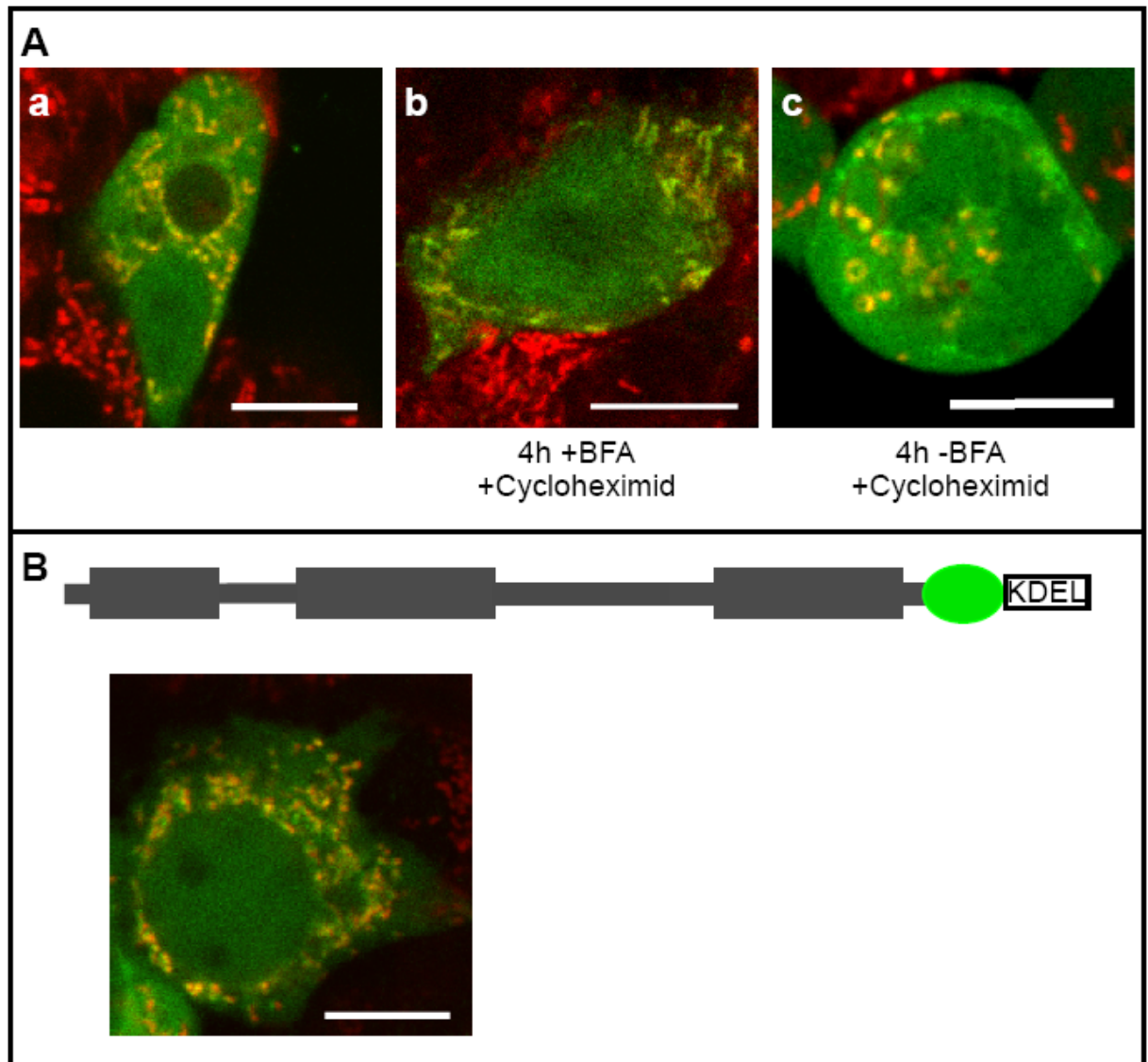


Abbildung 20: Eine Inhibierung des Vesikeltransports mit Brefeldin A hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Kesv::GFP in den Mitochondrien. CLSM-Aufnahmen des BFA-Assay mit Kesv-transfizierten und mit MitoTracker Red angefärbten HEK293-Zellen (**A**). Gezeigt sind Zellen 24 h nach der Transfektion (**a**), nach vierstündiger Inkubation mit 18 μ M BFA und 300 μ M Cycloheximid (**b**) sowie 4 h nach Entfernen von BFA (**c**). In (**B**) ist eine mit MitoTracker Red angefärbte HEK293-Zelle transfiziert mit dem Konstrukt Kesv::GFP-KDEL zu sehen. Der Größenbalken entspricht 10 μ m.

2.14 Hefekomplementationstest von Kcsv, Kcv, Chimären und Mutanten

Hefen eignen sich ebenfalls als heterologes Expressionssystem. In Hefen ist es relativ einfach Gene bestimmter Proteine zu deletieren und so Hefedeletionsmutanten herzustellen. Diese können dann verwendet werden, um zu testen, ob ein induziertes Protein die Funktion des endogenen, deletierten Proteins übernehmen kann (*rescue*). Im Falle von Kaliumkanälen bedeutet dies, dass Hefemutanten, bei denen die endogenen Kaliumtransporter TRK1 und TRK2 deletiert wurden, nur noch bei hohen Kaliumkonzentrationen von 100 mM überleben können, da in diesem Fall allein die Diffusion bzw. der Transport über andere Proteine die benötigte Kaliumaufnahme sichern. Um bei einer niedrigen Kaliumkonzentration (0,5 mM) überleben zu können, benötigen die Hefemutanten die Expression eines Fremdproteins, das die Kaliumaufnahme über die Plasmamembran ermöglicht. Dieses *rescue* konnte bereits sowohl für pflanzliche als auch tierische einwärtsgerichtete Kaliumkanäle nachgewiesen werden (Schachtmann *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1995; Zaks-Makhina *et al.*, 2004).

Für den Hefekomplementationstest wurde der *S. cerevisiae* Hefestamm SGY1528 (Tang *et al.*, 1995) verwendet, der Deletionen der beiden wichtigsten Kaliumeinwärtsgleichrichter TRK1 und TRK2 enthält.

Um zu überprüfen ob Kcv und Kcsv in den Deletionshefen die Kaliumaufnahme komplementieren können, wurden beide Gene zunächst in den veränderten Vektor pYES2 kloniert (Konstrukte wurden von Prof. Dan Minor (UC San Francisco)) zur Verfügung gestellt. Als Kontrollen für eine erfolgreiche Komplementation wurden der homologe TRK1-Transporter und der menschliche Kaliumkanal Kir1.2 kloniert in pYES2 verwendet.

Abbildung 21 zeigt die mit TRK1, Kir1.2, Kcv und Kcsv transfizierten Hefen auf 100 mM und 0,5 mM K⁺-Nährmedium. Bei einer Konzentration von 100 mM wachsen alle Hefen, da wie zuvor erwähnt durch Diffusion und unspezifische Kaliumaufnahme über andere Transportproteine genug Kalium zum Wachstum der Hefen vorhanden ist. Dagegen ist deutlich erkennbar, dass bei einer geringeren Kaliumkonzentration von 0,5 mM nur noch diejenigen Hefen wachsen können, die in der Plasmamembran einen funktionsfähigen Ersatz exprimieren. Die beiden Kontrollen TRK1 und Kir1.2 wachsen sehr gut, Kcv etwas weniger stark und Kcsv-transfizierte Hefen wachsen überhaupt nicht mehr. So wie erwartet scheint Kcv in der Plasmamembran exprimiert zu werden und einen funktionsfähigen Kaliumkanal auszubilden, während Kcsv entweder nicht funktionsfähig ist oder aber erst gar nicht in die Plasma-

membran eingebaut wird, sondern in einem anderen Organell der Hefen lokalisiert ist. Da allerdings das Fusionsprotein Kesv::GFP in HEK293-Zellen in die Mitochondrien transportiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass Kesv innerhalb der Hefen ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert ist.

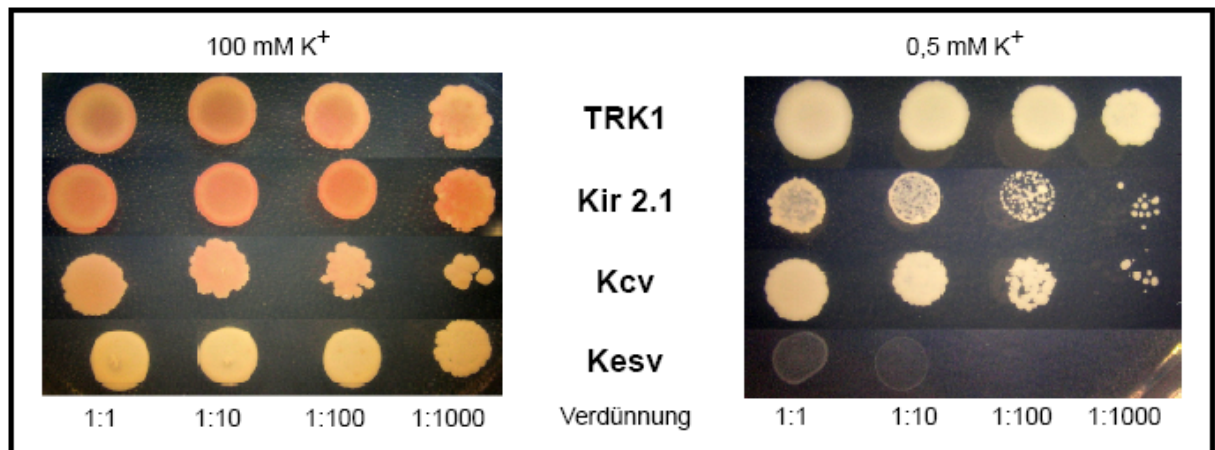


Abbildung 21: Tröpfchentest transfizierter Hefen mit den Kanälen TRK1, Kir1.2, Kcv und Kesv; Wachstum der transfizierten Hefen auf 100 mM und unter Selektionsdruck auf 0,5 mM K^+ -Nährmedium.

Für weitere Tests wurden Kesv-Mutanten mit Verlängerung der TM2 und alle Chimären, die in HEK293-Zellen eine veränderte Lokalisation zeigten, in das Hefepiasmid pYES2 kloniert bzw. durch eine *site directed mutagenesis* eingeführt. Sämtliche Konstrukte sind in Abbildung 23 aufgelistet. Der Komplementationstest wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Von allen Chimären konnte lediglich die Chimäre bestehend aus dem N-Terminus von Kesv und dem Kcv-Protein ab der TM1 ein *rescue* der Hefen ermöglichen (Abbildung 23). Dieses Ergebnis entspricht dem Befund, dass diese Chimäre in HEK293 Zellen in den sekretorischen Weg sortiert wird.

In Abbildung 22 sind die Komplementationstest der unterschiedlichen Kesv-Verlängerungsmutationen an Position 113 gezeigt. Für alle aufgeführten Verlängerungen konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen eine Lokalisation im sekretorischen Weg nachgewiesen werden. Mit einer Ausnahme führen auch in dem Hefetest diejenigen Mutanten, die in den sekretorischen Weg und damit zur Plasmamembran sortiert werden, zu einem Überleben der Hefen bei niedrigen Kaliumbedingungen. Die Mutanten von Kesv bei denen die TM2 um mehr als eine Aminosäure verlängert wurde (113VV, 113VM und 113VVV) sind in der Lage die Hefen zu komplementieren. Lediglich die Verlängerung um eine Aminosäure (113V) ist

nicht erfolgreich beim *rescue*. Dadurch wurden die Ergebnisse der Lokalisationsexperimente in den HEK293-Zellen bestätigt. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Kcsv-Verlängerungsmutanten funktionelle Kaliumkanäle in der Plasmamembran der Hefen bilden können.

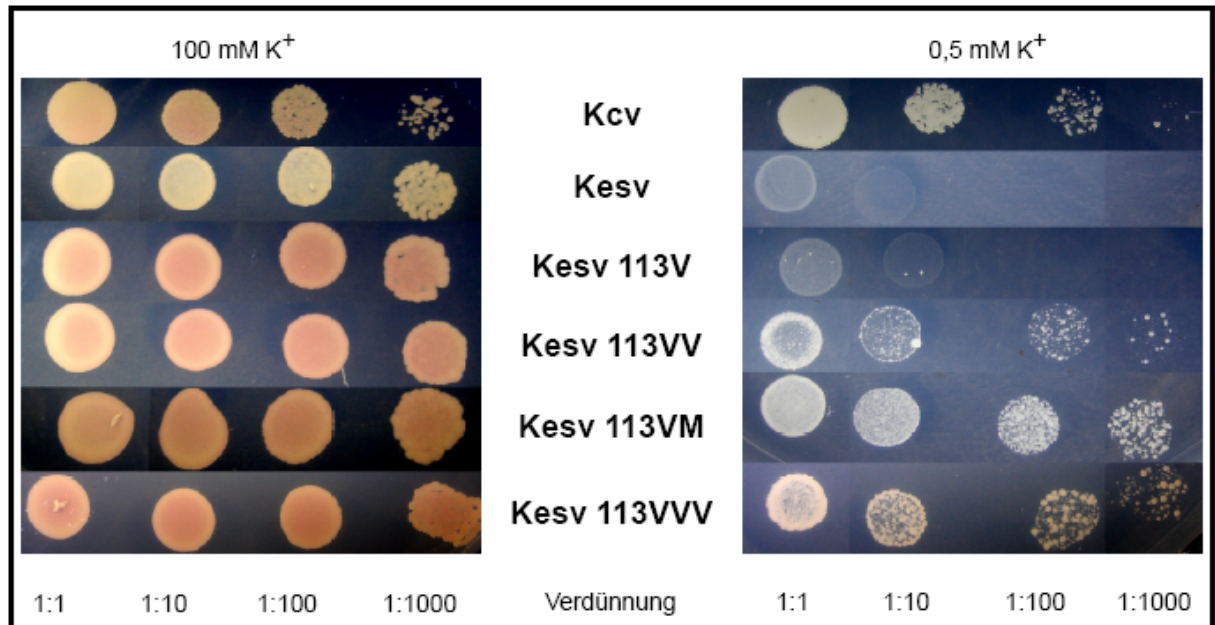


Abbildung 22: Tröpfchentest der Kcsv-Verlängerungsmutanten an Position 113; Wachstum der transfizierten Hefen auf 100 mM K^+ und unter Selektionsdruck auf 0,5 mM K^+ -Nährmedium.

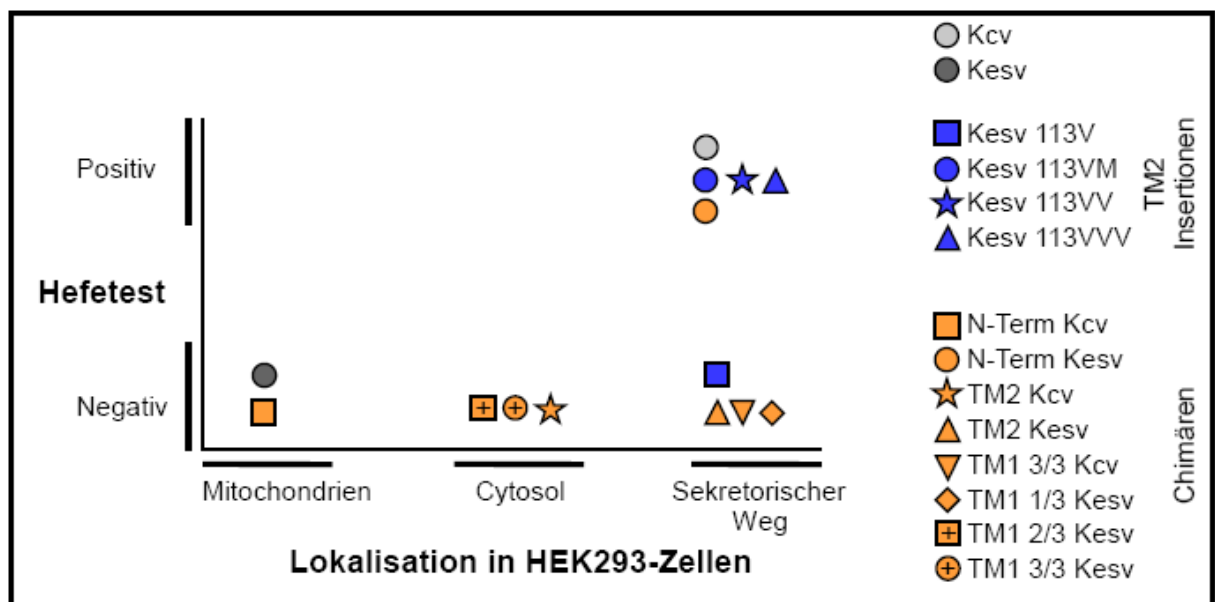


Abbildung 23: Graphische Darstellung der experimentell ermittelten Ergebnisse der Lokalisation in HEK293-Zellen und des Hefekomplementationstests für alle Mutanten und Chimären, mit denen der Hefekomplementationstest durchgeführt wurde.

3 Diskussion

Bei den *Phycodnaviridae* handelt es sich um eine Familie eikosaedrischer Viren mit doppelsträngiger DNA, die Algen aus Süß- und Salzwasser befallen. Zu den Algen, die von diesen Viren infiziert werden, gehört unter anderem der *Chlorella*-Stamm NC64A, der als Endosymbiont in *Paramecium bursaria* lebt. Dieser *Chlorella*-Stamm wird durch das *Paramecium bursaria chlorella Virus 1* (PBCV-1) infiziert. Die im Salzwasser lebende Braunalge *Ectocarpus siliculosus* wird vom gleichnamigen *Ectocarpus siliculosus Virus* (EsV-1) befallen.

Die Genome von PBCV-1 und EsV-1 wurden in Genomprojekten vollständig sequenziert. Dabei fanden sich zwischen den beiden sehr großen Genomen von über 300 kbp allerdings nur etwa 10 % gleiche Gene (Van Etten *et al.*, 2002). Zu diesen Genen gehören unter anderem zwei Kaliumkanäle. Es gibt viele Hinweise darauf, dass der Kaliumkanal Kcv aus PBCV-1 eine essentielle Rolle bei der Virusreplikation spielt (Mehmel *et al.*, 2003). Daher könnte dem potentiellen Kaliumkanal Kesv aus dem *Ectocarpus*-Virus möglicherweise ebenfalls eine wichtige Rolle im Lebenszyklus von EsV-1 zukommen. Diese Frage kann in dieser Arbeit jedoch nicht direkt beantwortet werden. Die Befunde zeigen jedoch, dass Kesv tatsächlich ein funktionelles Kaliumkanalprotein ist; jedoch zeigen die Resultate der heterologen Expression von Kesv und Kcv, dass die beiden Proteine zu ganz unterschiedlichen Zielmembranen sortiert werden und daher wahrscheinlich grundsätzlich verschiedene Funktionen im Replikationszyklus der Viren haben.

Das Gen aus PBCV-1, Kcv, konnte in verschiedenen Expressionssystemen als funktioneller Kaliumkanal charakterisiert werden (Plugge *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2002). Auch für den K⁺-Kanal, Kesv, aus EsV-1 wurde eine Funktion in *Xenopus laevis* Oocyten postuliert (Chen *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse stehen jedoch nicht im Einklang mit den Resultaten anderer Untersuchungen, in denen Kesv in *Xenopus* Oocyten, HEK293- und CHO-Zellen exprimiert wurde. Es stellte sich heraus, dass das Genprodukt keine reproduzierbare Kaliumleitfähigkeit in diesen Expressionssystemen induziert (Mehmel, 2004). Weiterhin wurde in dieser Untersuchung beobachtet, dass ein Fusionsprotein aus Kesv und GFP eine völlig andere zelluläre Lokalisation als Kcv::GFP in HEK293- und CHO-Zellen zeigte, in denen Kcv::GFP messbare Stromantworten lieferte (Mehmel, 2004).

Das zentrale Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass Kesv::GFP bzw. Kesv allein in der Tat

nicht zur Plasmamembran, sondern in die Mitochondrien geschleust werden. Die Aktivität des Kanals in der Plasmamembran der heterologen Expressionssysteme HEK293-Zellen und Hefen ist lediglich dann nachweisbar, wenn die Sortierung durch Mutationen in Kcsv derart verändert wird, dass das Protein in den sekretorischen Weg eingeht und damit zur Plasmamembran gelangt.

3.1 Kcsv::GFP ist in den Mitochondrien lokalisiert

Die vorliegenden Lokalisationsdaten zeigen in mehrfacher Hinsicht, dass das Kcsv-Protein in die Mitochondrien sortiert wird: Es kolokalisiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red, welcher spezifisch die Mitochondrien der Zelle markiert. Ferner kann es in isolierten Mitochondrien detektiert werden. Neben diesen experimentellen Befunden spricht auch die Proteinstruktur für eine solche Lokalisation. Verschiedene Algorithmen (Claros und Vincens, 1996; Emanuelsson *et al.*, 2000), die zur Lokalisationsvorhersage eines Proteins innerhalb der Zelle dienen, sagen eine mitochondriale Lokalisation von Kcsv vorher, wohingegen die gleichen Vorhersageprogramme für Kcv nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation in den Mitochondrien ausgeben.

Mit der mitochondrialen Lokalisation des Proteins können nun nachträglich verschiedene frühere experimentelle Befunde erklärt werden:

(1) Kcsv::GFP zeigte in transfizierten HEK293- und CHO-Zellen keine deutlich erhöhte Leitfähigkeit (Mehmel, 2004). Entsprechend ihrer intrazellulären Lokalisation ist dies auch nicht zu erwarten. Die gleiche Interpretation trifft für Kcsv-wt im Hefekomplementationstests zu. Lediglich Kcv, also der Kanal, der über den sekretorischen Weg sortiert wird, ist in der Lage, die defizienten Hefen zu komplementieren. Seiner Lokalisation in den Mitochondrien entsprechend, ist Kcsv nicht in der Lage dies zu tun. Wenn allerdings die Struktur von Kcsv so verändert wird, dass das Protein zur Plasmamembran wandert, kann auch dieser Kanal die Hefen komplementieren.

(2) Die Ergebnisse von Chen *et al.* (2005), die eine von Kcsv induzierte Leitfähigkeit in *Xenopus laevis* Oocyten postulieren, erscheinen im Licht der Lokalisationsdaten eher fraglich. Bei der Expression in Oocyten konnte Mehmel (2004) zwar eine erhöhte Leitfähigkeit feststellen, aber keine Kalium-Selektivität. Hinsichtlich der vorliegenden Daten muss davon ausgegangen werden, dass die erhöhten Leitfähigkeiten auf die Hochregulation von endogenen

Strömen zurückzuführen sind. Eine derart unspezifische Aktivierung zelleigener Kanäle wird gelegentlich bei der Überexpression von Fremdproteinen in *Xenopus* Oocyten beobachtet (Weber, 1999).

Letztlich weisen die Befunde darauf hin, dass Kcsv gemäß seiner Strukturmerkmale in der Lage ist, einen funktionellen Kaliumkanal zu formen. Ferner lässt sich aus der Übereinstimmung der Daten aus Säugerzellen, *Xenopus* Oocyten und Hefen schließen, dass die differenzielle Verteilung der beiden sehr ähnlichen Kanäle nicht nur die Besonderheit eines einzelnen Zelltyps ist, sondern eine allgemeine biologische Bedeutung hat.

Aus diesem Grund erscheint es sehr interessant, mit Hilfe der beiden Kanäle Abläufe während der Proteinsortierung bzw. der Proteintranslokation näher zu untersuchen. Womöglich könnte dies die Entscheidungskriterien für co- und post-translationale Proteintranslokation näher beleuchten. Bekannt ist, dass ab einem bestimmten Grenzwert der Hydrophobizität einer Proteinesequenz das translatierte Protein nicht mehr vom *signal recognition particle* (SRP) erkannt und so nicht co-translational inseriert wird. Dies bedeutet, dass das Protein auf einem post-translationalen Weg weiterverarbeitet wird (Hegde und Bernstein, 2006).

Wie Kcv, Kcsv und Mutanten beider Kanäle sortiert und inseriert werden, wurde in Ansätzen bereits untersucht. Durch die starke Homologie von Kcsv und Kcv und die Tatsache, dass nur geringe Veränderungen in Kcsv zu einem veränderten *targeting* führen, wurde die Möglichkeit überprüft, ob Kcsv wie Kcv zuerst in das ER integriert wird und dann von dort entlang einem noch unbekannten Weg in die Mitochondrien gelangt. Dies wurde unter anderem auch deshalb näher untersucht, da Villarejo *et al.* (2005) zeigen konnten, dass CAH1, ein Chloroplastenprotein, vom ER über den Golgi-Apparat in die Chloroplasten gelangt. Dazu muss man wissen, dass sich Chloroplasten und Mitochondrien in ihrem Import sehr ähnlich sind. Die Proteine beider Organellen werden laut bisheriger Lehrmeinung im Cytosol translatiert und dann über vergleichbare Proteinkomplexe in die Organellen eingebaut. Der von Villarejo *et al.* entdeckte Transportweg war bis dato für Chloroplastenproteine noch völlig unbekannt. In Anlehnung an die Versuche von Villarejo *et al.* wurde ein ER-Retentionssignal (KDEL; Munro und Pelham, 1997) C-terminal an das Fusionsprotein fusioniert, um zu überprüfen, ob das ER ein Zwischenstopp von Kcsv::GFP auf dem Weg in die Mitochondrien ist; das Retentionssignal hatte jedoch keine Auswirkung auf die mitochondriale Verteilung von Kcsv::GFP. Ein zweiter Versuch, den ebenfalls Villarejo *et al.* durchführten, um den Vesikeltransport am Golgi-Apparat durch Brefeldin A (BFA) zu unterbrechen und so einen

Weitertransport zu den Chloroplasten zu verhindern, zeigte keine Änderung der mitochondrialen Lokalisation von Kesv. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kesv weder das ER noch den Golgi-Apparat während seines Transportweges zu den Mitochondrien passiert und somit auf jeden Fall post-translational im Cytosol sortiert wird. Ob Kcv auf co- oder post-translationale Weise in den sekretorischen Weg gelangt, konnte bisher nicht geklärt werden.

3.2 Kesv trägt mindestens zwei Signale für die mitochondriale Lokalisation

In der Regel besitzen mitochondriale Proteine eine N-terminale Signalsequenz (Neupert und Herrmann, 2007). Es ist aber auch bekannt, dass ein solches Signal nicht unbedingt von Nöten ist, falls ein anderes, integrales Mitochondriensignal im Protein existiert (Gibbs *et al.*, 2003; z.B.: PB1-F2). Die unterschiedliche Sortierung der Mutanten und Chimären von Kesv bzw. Kcv zeigt, dass es eine Kombination von mindestens zwei Signalen ist, die für die mitochondriale Sortierung verantwortlich ist.

(1) Der N-Terminus enthält eine mitochondriale Signalsequenz

N-terminale Signale kommen sehr häufig in mitochondrialen Proteinen vor. Bei den Signalen handelt es sich meist um amphipatische, helicale Strukturen, die einen hydrophoben Charakter aufweisen und gleichzeitig mehrere positive Ladungen tragen (von Heijne, 1986; Schatz, 1987; Schwarz und Neupert, 1994; Lithgow, 2000). Die Signale der Proteine werden noch während der Translation an den freien Ribosomen erkannt und die translatierten Proteine werden anschließend zu den Importkomplexen der Mitochondrien gebracht (Neupert und Herrmann, 2007).

Anhand verschiedener Befunde kann belegt werden, dass der N-Terminus von Kesv eine Signalsequenz für die Mitochondrien trägt:

(1) Wie zuvor bereits erwähnt, stützen verschiedene Vorhersagealgorithmen den Befund der mitochondrialen Lokalisation von Kesv. Von einigen Transmembranvorhersagealgorithmen wird in dieser Region eine Transmembrandomäne erwartet, weshalb auf eine helicale Struktur geschlossen werden kann. Außerdem enthält der N-Terminus mehrere positive Ladungen. Diese beiden Eigenschaften, hydrophobe und α -helicale Bereiche sowie darin enthaltene posi-

tive Ladungen, sprechen für ein typisches Mitochondriensignal (Waltner und Weiner, 1995; Endo und Kohda, 2002).

(2) Das überzeugendste Argument für ein Signal im N-Terminus ist allerdings, dass der N-Terminus von Kevs (M1-T36) ein Reporterprotein (GFP) erfolgreich in die Mitochondrien leiten kann. Durch Mutationen im N-Terminus, bei denen zwei positive Aminosäuren durch zwei negative ersetzt werden und infolgedessen die Signalsequenz zerstört wird, kann dies unterbunden werden.

Wie die aufgeführten Befunde zeigen, entspricht der N-Terminus einem typischen mitochondrialen Signal und ist ebenso in der Lage ein normalerweise cytosolisch lokalisiertes Protein (GFP) in die Mitochondrien umzuleiten. Allerdings reicht die Signalstärke des N-Terminus nicht dazu aus, ein anderes Membranprotein, nämlich Kev, in die Mitochondrien zu dirigieren. Es scheint in diesem Fall eine Hierarchie innerhalb der Signale zu geben, in der das Mitochondriensortierungssignal dem Signal für den sekretorischen Weg untergeordnet ist. In diesem Zusammenhang ist es umso überraschender, dass eine Chimäre von Kevs mit dem N-Terminus von Kev, trotz Verlusts des funktionsfähigen N-terminalen Signalpeptids, in den Mitochondrien zu finden ist. Dieses Ergebnis ist auch deshalb verwunderlich, weil für andere mitochondriale Membranproteine gezeigt werden konnte, dass diese ohne ihr ursprüngliches Signalpeptid nicht in die Mitochondrien gelangen können (z.B. Graf *et al.*, 2004). Es konnten allerdings auch Proteine identifiziert werden, die keine N-terminale Signalsequenz benötigen: Diese verfügen dann über integrale und nicht N-terminale Mitochondrienimportsignale. Solche Signale sind für einige Proteine der inneren Mitochondrienmembran bekannt (Endo und Kohda, 2002). Auch ein virales Protein besitzt dieses Signal, welches ihm ein *targeting* in die Mitochondrien ermöglicht (Gibbs *et al.*, 2003).

Insgesamt lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass neben dem N-Terminus noch ein weiteres Signal in Kevs verborgen sein muss. Fraglich ist in diesem Zusammenhang jedoch die eigentliche Funktion des N-Terminus, da das Protein auch ohne ihn in die Mitochondrien importiert wird. Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein des N-Terminus ist, dass er dazu beiträgt, die Effizienz des Imports von Kevs zu erhöhen, dass beide Signale gemeinsam also eine größere Anzahl von Kevs-Proteinen in die Mitochondrien bringen. Eine weitere Funktion des N-Terminus liegt möglicherweise im submitochondrialen *targeting* von Kevs. Es gibt Beispiele, in denen Proteine mehrere unterschiedliche Signale enthalten, denen jeweils

eine andere Funktion zukommt. So wird das erste Signal, das für den Mitochondrienimport benötigt wird, nach gelungenem Import abgeschnitten und ein zweites Signal tritt zum Vorschein, das dann die weiteren Zielsignale für die submitochondriale Verteilung enthält (Neupert und Herrmann, 2007).

In diesem Zusammenhang sollte auf jeden Fall erwähnt werden, dass bei Kesv::GFP transfizierten Zellen nicht nur eine GFP-Fluoreszenz in den Mitochondrien, sondern auch immer eine Hintergrundfluoreszenz im Cytosol beobachtet werden konnte. Diese cytosolische GFP-Fluoreszenz wurde zunächst immer als Effekt von unspezifisch abgespaltenen GFP des Fusionsproteins gesehen. Dafür spricht auch, dass bei Western-Blot-Analysen transfizierter Zellen oft nur eine Bande in Höhe des GFP und selten eine Bande des Fusionsproteins gefunden wurde (Moroni *et al.*, 2003). Im Licht der neuen Daten könnte dieses GFP jedoch auch das Produkt eines Abbaus von nicht richtig sortiertem Protein sein, das im Cytosol endet und dann in den Lysosomen abgebaut wird.

Für die im Cytosol beobachtete GFP-Fluoreszenz besteht durchaus noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit: Signalsequenzen können sich in der Effektivität ihres vermittelten Imports unterscheiden. Die Effizienz wird durch die unterschiedliche Bindungsstärke der Signalsequenzen an den Translokationsapparat beeinflusst. Diese Variabilität kann physiologische Gründe haben: Durch eine ineffektive Bindung kann es zu dualen *targeting* kommen, indem beispielsweise die Translokation langsamer verläuft und ein anderer Faktor an das Protein bindet und eine bestimmte Proteinmenge zu einem anderen Ziel befördert (Hegde und Bernstein, 2006). Für Kesv könnte dies auch eine physiologische Bedeutung haben; es muss aber immer berücksichtigt werden, dass die gewonnenen Erkenntnisse auf Grundlage einer heterologen Expression gewonnen wurden, die sich von derjenigen *in vivo* unterscheiden kann.

Um diese Hypothese zu überprüfen, bedarf es weiterer Experimente. Durch Importstudien in Mitochondrien *in vitro* könnten beispielsweise die Importeffizienzen verschiedener Kesv-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt werden. Die Untersuchungen zur submitochondrialen Verteilung könnten durch Fraktionierung der einzelnen Mitochondrienbestandteile und anschließender proteinchemischer Analysen durchgeführt werden. Im Zuge dieser Arbeiten kann auch geklärt werden, ob das Signal im N-Terminus nach dem Import in die Mitochondrien abgespalten wird.

(2) Veränderung des *targeting* durch Verlängerung der TM2

Mehmel (2004) konnte bereits zeigen, dass eine Verlängerung der TM2 von Kesv an Position 113 um drei bzw. sechs Aminosäuren eine veränderte Lokalisation nach sich zieht. Auch eine Chimäre, die aus der Klonierung der Kesv-Porenregion zwischen die Transmembrandomänen von Kcv hervorging und somit im Vergleich zu Kesv eine längere TM2 besitzt, zeigte eine Expression an der Plasmamembran; dadurch konnte diese Chimäre mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik elektrophysiologisch charakterisiert werden. Es scheint, als ob im Bereich der TM2 ein weiteres Mitochondrienimportsignal enthalten ist.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Länge von Transmembrandomänen entscheidend dafür sein kann, in welchem Kompartiment der Zelle das Konstrukt lokalisiert ist. Ein solcher Sortierungsmechanismus konnte bisher in tierischen Zellen (Pedrazzini *et al.*, 1996), in Hefe (Rayner und Pelham, 1997), in Pflanzen (Brandizzi *et al.*, 2002) sowie dem Protozoon *Toxoplasma gondii* (Karsten *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. Diesem Mechanismus liegt der Befund zugrunde, dass in tierischen und pflanzlichen Zellen die Membrandicken von innen nach außen zunehmen (Rayner und Pelham, 1997).

Die bereits erwähnten Erkenntnisse Mehmeis (2004) konnten durch weitere Experimente in dieser Arbeit bestätigt und detaillierter beschrieben werden. Aus der Tatsache, dass auch andere Aminosäuren als die von Mehmel verwendeten ein verändertes *targeting* verursachen, kann geschlossen werden, dass diese weder selbst ein Signal darstellen noch durch ihre Präsenz ein solches in dieser Umgebung erzeugt haben. Auch die Anzahl der eingefügten Aminosäuren an Position 113 von Kesv ist nicht kritisch. Eine Verlängerung um eine einzige Aminosäure reicht prinzipiell aus, um die entsprechende Umorientierung im *targeting* zu gewährleisten. Es ist aber erkennbar, dass längere Insertionen (bis hin zu sechs zusätzlichen AS) eine deutlichere Verteilung im sekretorischen Weg zeigen. Diese Beobachtung könnte als eine Art Wettbewerb zweier Signale gedeutet werden: Ist die Verlängerung kurz, ist der Effekt auf das *targeting* nicht so groß, weil womöglich noch beide Signale eine Wirkung haben; bei längeren Insertionen scheint das eingeführte Signal in seiner relativen Stärke zuzunehmen und ist damit quasi dominierend für das *targeting*. Solche Konkurrenzsituation zweier verschiedener, im selben Protein enthaltener Signale und ihren Rezeptoren haben einen großen Einfluss auf die relative Verteilung eines Proteins innerhalb der Zelle (Karniely und Pines, 2006).

Offensichtlich ist jedoch nicht allein die hydrophobe Länge der TM2 als Sortierungssignal ausreichend; die TM2 muss ortspezifische Information für den Sortierungsprozess enthalten.

Die Verlängerung in der TM2 muss im stromabwärts gelegenen Bereich der Domäne erfolgen um eine Umorientierung von einer mitochondrialen Sortierung zu einer in den sekretorischen Weg zu gewährleisten. Dies könnte indirekt auf die Funktion eines Rezeptors bei der Erkennung der TM2 und der Sortierung der Kanäle hinweisen. Auch die Verteilung zweier weiterer Chimären lässt diesen Schluss zu. Die Chimäre, bei der die komplette Kesv-Region nach dem Filter gegen die entsprechende Region von Kcv ausgetauscht und dadurch eine längere Transmembrandomäne eingefügt wurde, zeigt eine cytosolische Verteilung, ist also weder im ER noch in den Mitochondrien lokalisiert. Bei der Chimäre von Kcv mit der TM2 von Kesv hatte die kürzere TM2 von Kesv keinen Einfluss auf die reguläre Sortierung von Kcv in den sekretorischen Weg. Dementsprechend ist nicht nur die generelle Länge der TM2 für das *targeting* entscheidend, sondern auch andere strukturelle Kriterien im Kanalprotein müssen bei der Sortierung beteiligt sein. Eine Verteilung der Proteine entsprechend der Membrandicke, wie zuvor vorgeschlagen, ist nicht ausreichend für die Erklärung der Verteilungsmuster.

Auch weitere Veränderungen in diesem Bereich haben eine Auswirkung auf die Sortierung. Diese fanden keine Erwähnung im Ergebnisteil sollen hier aber kurz erwähnt werden. So konnte beispielsweise die Insertion eines ER-Exportmotivs (FCYENE; Ma *et al.*, 2001) im *linker* des Fusionsproteins ein verändertes *targeting* des Proteins in den sekretorischen Weg verursachen. Auch im Falle eines Austauschs des GFPs gegen einen HA-tag (Hämagglutinin-tag, YPYDVPDYA) konnte Kesv nicht mehr in den Mitochondrien lokalisiert werden. Es kann nur vermutet werden, auf welche Weise solch unterschiedliche Manipulationen des Proteins seine Sortierung in die Mitochondrien unterbinden. Als einzige Erklärung scheinen die beiden negativ geladenen Aminosäuren (EXE, DXXD), die beiden Motiven gemeinsam sind, in Frage zu kommen: Da positive Ladungen eine wichtige Rolle in N-terminalen Signalsequenzen spielen (Waltner und Weiner, 1995; Endo und Kohda, 2002), ist es möglich, dass noch ein zweites bzw. globuläres Signal besteht und die beiden eingeführten negativen Ladungen einen Einfluss auf die Wechselwirkungen des Proteins mit einem Interaktionspartner (Rezeptor, Chaperon), der für das *targeting* wichtig ist, haben.

Bei dem Signal, das für den Mitochondrienimport zuständig ist, scheint es sich also weniger um ein sequenzspezifisches Signal, sondern vielmehr um ein von verschiedenen Abschnitten des Proteins beeinflusstes, dreidimensionales Signal zu handeln. Für eine Art 3D-Signal

sprechen auch Lokalisationsstudien weiterer Chimären: Eine aus dem N-Terminus und der TM2 von Kcsv sowie der TM1 und der Pore von Kcv bestehende Chimäre gelangt trotz N-terminaler mitochondrialer Signalsequenz und kürzerer TM2 nicht in die Mitochondrien, sondern in den sekretorischen Weg. Durch stetige Vergrößerung des Kcsv-Anteils in der TM1 der Chimäre konnte gezeigt werden, dass durch eine Ergänzung der ersten sieben Aminosäuren der TM1 noch immer keine mitochondriale Verteilung hergestellt werden konnte. Die Einführung weiterer acht oder auch 16 Aminosäuren der TM1 von Kcsv führte zum Verlust jeglichen Signals; die Chimären konnten nur im Cytosol lokalisiert werden. Die Hypothese, dass ein dreidimensionales Signal für die Sortierung von Kcsv verantwortlich gemacht werden kann, wird durch Beobachtungen an drei Proteinen der inneren Mitochondrienmembran (Bcs1, Mdj2 und Tim14) untermauert, bei denen ein sehr ungewöhnliches Importsignal festgestellt werden konnte. Sie besitzen eine interne Mitochondriensignalsequenz, die C-terminal zu einem hydrophoben Abschnitt liegt. Die beiden Strukturen können einen *hairpin loop* ausbilden, der die Eigenschaften einer amphipatischen Helix trägt und so dieses typische Mitochondrienimportsignal imitiert (Neupert und Herrmann, 2007). Damit ein solches Signal neben den einfachen Signalsequenzen, die selbst eine sehr hohe Sequenzvariabilität aufweisen, erkannt werden kann, bedarf es einer sehr toleranten Erkennungsmaschinerie (Hegde und Bernstein, 2006).

Zusätzlich zu diesen ungewöhnlichen dreidimensionalen Signalen wurden auch Auswirkungen von Signalsequenzen auf andere Proteinabschnitte beobachtet. Dabei wurde erkannt, dass die Zusammensetzung von Signalsequenzen einen Einfluss auf stromabwärtsliegende Transmembrandomänen und Glykosilierungsstellen haben kann; genauso können diese stromabwärtsgelegenen Domänen auch auf eine N-terminale Signalsequenz rückwirken (Rehm *et al.*, 2001; Rutkowski *et al.*, 2003; Ott und Lingappa, 2004). Solche Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bereichen eines Proteins könnten bei Kcsv ebenfalls Auswirkungen auf die Sortierung und somit das *targeting* haben. Veränderungen in bestimmten Abschnitten der TM2 könnten Wechselwirkungen innerhalb des Proteins stören und so zu einem anderen *targeting* führen.

3.3 Funktionalität der Mutanten und Chimären mit verändertem *targeting*

Der Hefekomplementationstest ist eine hervorragende Methode, um funktionelle Kaliumkanä-

le nachzuweisen. In vielen vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Expression sowohl pflanzlicher als auch tierischer einwärtsgerichteter Kaliumkanäle die Kaliumaufnahme in $\Delta trk1 \Delta trk2$ -Hefestämmen komplementieren kann (Schachtmann *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1995; Zaks-Makhina *et al.*, 2004).

Auch die Expression von Kcv bewirkt ein Wachstum der Hefen auf Nährmedien mit geringer Kaliumkonzentration. Kesv transfizierte Hefen können nicht komplementiert werden, was darauf hindeutet, dass Kesv nicht in die Plasmamembran der Hefen gelangt. Die Ergebnisse der Hefekomplementationstests stehen somit sowohl mit den elektrophysiologischen Daten als auch den Lokalisationsexperimenten in Einklang, in denen Kesv in den Mitochondrien und Kcv an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnten.

Für drei Mutanten von Kesv, die in den Lokalisationsstudien ein verändertes *targeting* zeigen, konnte im Hefekomplementationstest ihre Funktionalität nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um Kesv-Varianten mit verlängerter TM2 (113 VM, 113VV und 113VVV). Sämtliche weiteren getesteten Mutanten und Chimären von Kesv konnten die Hefen nicht komplementieren. Damit wird deutlich, dass das Hefesystem nur als positiver Test gesehen werden kann; lediglich funktionelle und in der Plasmamembran eingebaute Kanäle können einen positiven Test bewirken. Im Falle eines negativen Komplementationstests kann keine nähere Aussage bezüglich der hierfür vorliegenden Gründe getroffen werden. Es bleibt Spekulation, ob die Kanäle in die Plasmamembran eingebaut werden und dort keine funktionelle Proteinstruktur einnehmen oder ob die Hefen durch die exprimierten Kanäle geschädigt werden und infolgedessen absterben. Der erste Punkt dürfte vor allem auf die Chimären zutreffen. Durch die oft experimentell bedingte Zusammensetzung der Chimären aus verschiedenen Abschnitten von Kesv und Kcv (Baukastenprinzip), erscheint ein Funktionsverlust nicht unwahrscheinlich. Für Kcv konnte gezeigt werden, dass innerhalb des Proteins Interaktionen zwischen Aminosäuren aus unterschiedlichen Sequenzabschnitten bestehen, die entscheidend zur Funktion des Kanals beitragen (Gazzarrini *et al.*, 2004). Hertel *et al.* (2006) konnte allein durch den Austausch oder die Insertion von nur einer Aminosäure im vorderen Bereich der TM1 von Kcv nachweisen, dass dies zu einem kompletten Verlust der Funktion des Proteins führen kann. Ein weiterer Grund für einen negativen Komplementationstest kann in einem unterschiedlichen *targeting* liegen, dass durch die Mutationen und Chimärenbildung hervorgerufen wird.

Auch wenn in den meisten Fällen keine konkrete Aussage über die Gründe eines negativen

Tests getroffen werden kann, darf über die Ursache in einigen Fällen durchaus diskutiert werden. Im Falle der Kesv-Verlängerungsmutanten spricht vieles dafür, dass die zuvor bereits erwähnte und in Hefen nachgewiesene Sortierung nach der Transmembrandomänenlänge greifen könnte (Rayner und Pelham, 1997). Für alle drei Verlängerungen (113V, 113VV und 113VVV) konnte optisch eine Lokalisation über den sekretorischen Weg gezeigt werden. Lediglich die beiden längeren Varianten zeigten jedoch eine positive Komplementation der Hefen. Möglicherweise gelangt die Variante mit nur einer Insertion aufgrund ihrer Länge nicht an die Plasmamembran, während jede zusätzliche Aminosäure eine Lokalisation in der Plasmamembran bedeutet und dadurch einen Fluss von Kaliumionen ermöglicht. Hierfür spricht auch das Konstrukt aus Kesv und dem FCYENE-Motiv (nicht im Ergebnisteil erwähnt). Dieses Konstrukt wird aus nicht näher bekannten Gründen in den sekretorischen Weg geleitet, kann aber, aufgrund der kürzeren TM2, die verhindert, dass das Protein nicht an die Plasmamembran gelangt, keine positive Komplementation hervorrufen. Dieser Zusammenhang lässt sich wahrscheinlich damit erklären, dass Membranproteine und die Lipidmembran, in der sie sich befinden, exakt zueinander passen müssen. Ist eine Transmembrandomäne länger als die umgebende Membran, kommt es zu einem so genannten hydrophoben *mismatch*. Dieser *mismatch* wiederum ist thermodynamisch ungünstig für die Struktur von Protein und umliegender Membran und kann durchaus zu Änderungen in der Aktivität von Membranproteinen führen (Strandberg und Killian, 2003; Yuan *et al.*, 2004; Hertel *et al.*, 2006).

Ein weiterer bisher nicht angesprochener Punkt ist, dass die Kanalproteine aus Algenviren stammen, aber in Säugerzellen und Hefe exprimiert wurden. Da weder die Membran in der die viralen Kanäle *in vivo* aktiv sind, noch die entsprechenden Membraneigenschaften bekannt sind, ist nicht auszuschließen, dass sich das Expressionsmuster im heterologen System von dem im natürlichen System unterscheidet. Es ist durchaus möglich, dass identische Proteine in unterschiedlichen Expressionssystemen eine vollkommen andere Lokalisation aufweisen, wie dies beispielsweise schon für die *tail anchored proteins* (TA-Proteine) nachgewiesen werden konnte. Zu den TA-Proteinen gehören unter anderem auch Cytochrome der b5-Familie. Verschiedene Proteine dieser Familie aus Kaninchen und aus *Arabidopsis thaliana* wurden in pflanzlichen und tierischen Expressionssystemen exprimiert. Dabei wurden sie zwar auf eine ähnliche Art und Weise sortiert, allerdings zeigte sich in Pflanzen eine abgewandelte Sortierung. Daraus kann geschlossen werden, dass Pflanzen noch weitere, bislang nicht charakterisierte Mechanismen zur Sortierung von TA-Proteinen besitzen (Borgese *et al.*,

2007; Maggio *et al.*, 2007). Um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können, ist die Verwendung verschiedener Expressionssysteme deshalb unabdingbar. Im Fall von Kesv zeigen die bisher verwendeten Expressionssysteme (HEK293-Zellen, *Xenopus* Oocyten und Hefen) miteinander vergleichbare Ergebnisse. Dennoch erscheint es, wie anhand des zuvor erwähnten Beispiels ersichtlich, notwendig, weitere Informationen zur Lokalisation von Kesv im pflanzlichen System zu erlangen, bevor Rückschlüsse auf dessen Funktion im Virusreplikationszyklus gezogen werden können.

3.4 Physiologische Bedeutung von Kesv

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen kann mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass Kesv im Vergleich zu Kcv im Virusreplikationszyklus eine andere Funktion zukommt. Für Kcv wird angenommen, dass er in der inneren Membran des Virus eingebaut ist und bei der Infektion eine wichtige Rolle spielt. Bei einer Virusinfektion dockt das Virus an die Algenzelle an, die Zellwand wird lysiert und die innere Membran des Virus fusioniert mit der Plasmamembran des Wirtes. Durch das Vorhandensein von Kcv in der Plasmamembran kommt es zunächst zu einer Depolarisation der Wirtsmembran und anschließend zu einem Ausstrom von Kalium und somit einer Absenkung des Turgors. Da der Turgor in Algen bis zu 10 bar betragen kann (Bisson und Kirst, 1995), kann der Virus bei einem geringeren Turgor der Zellen seine DNA injizieren (Mehmel *et al.*, 2003). Durch die mitochondriale Lokalisation von Kesv im heterologen System scheint für ihn eine ähnliche Funktionsweise bei der Infektion ausgeschlossen zu sein. Ebenso unterscheiden sich die Lebenszyklen der beiden Viren. Während PBCV-1 (Kcv) ein lytischer Virus ist, d.h. die befallenen Algen nach der Infektion absterben, zeigt EsV-1 (Kesv) einen lysogenen Replikationszyklus. Er integriert nach der Infektion sein Genom in das Wirtsgenom, welches anschließend nach den Mendelschen Regeln weitervererbt wird (Delaroque *et al.*, 1999). Die Vermehrung und Freisetzung von EsV-1 erfolgt nur in den Sporangien und Gametangien der Alge. Da die Freisetzung von reproduktiven Zellen ohnehin zur Funktion der Reproduktionsorgane gehört, überleben die Braunalgen die Virusreplikation unbeschadet.

Die Frage der Funktion könnte unter Umständen durch Immunolokalisationsstudien geklärt werden. Sobald ein Antikörper gegen Kesv verfügbar ist, könnte die Kesv-Lokalisation, sowohl innerhalb des Virus, sofern das Protein dort integriert ist, als auch während des Replikationszyklus im Wirt, durch Immunogold-Markierungs-Experimente bestimmt werden.

Die weiteren Untersuchungen, die auf die physiologische Bedeutung von Kesv bei der Virusreplikation abzielen, sind auch deshalb so interessant, da auch medizinisch relevante Viren in ihrem Genom für ionenleitende Proteine kodieren. Zu diesen Proteinen gehören PB1-F2 aus *Influenza A* (Chen *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2004), das M2-Protein ebenfalls aus *Influenza A* (Pinto *et al.*, 1992), das p7-Protein aus dem Hepatitis C Virus (HCV) (Griffin *et al.*, 2004) und Vpu aus dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV-1) (Schubert *et al.*, 1996). Besonders hervorzuheben ist PB1-F2, das in die innere Mitochondrienmembran sortiert wird und dort allem Anschein nach den virusinduzierten Zelltod einleitet (Chen *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2004).

3.5 Resümee und Ausblick

Im Rahmen der vorgestellten Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass Kesv post-translational sortiert wird. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der Hypothese, dass nach der vollständigen Translation des Kanalproteins bestimmte Interaktionsfaktoren (Chaperone und Rezeptoren) an Kesv binden bzw. Wechselwirkungen mit Kesv eingehen. Durch diese Interaktionen wird das weitere Schicksal von Kesv festgelegt. Da Kesv und die Mutanten verschiedene Sortierungssignale enthalten, kommt es zu einer Art Wettstreit zwischen den Signalen. Je nachdem, welches Signal aus dieser Konkurrenz als Sieger hervorgeht, d.h., welcher Interaktionspartner am besten mit dem Protein wechselwirken kann, wird das Protein in das spezifische Kompartiment sortiert. Für den Fall, dass die Signale durch Mutationen nicht mehr erkannt werden und somit eine Sortierung unmöglich gemacht wird, verbleibt das translatierte Protein im Cytosol.

Da Viren zelluläre Systeme für ihren eigenen Vorteil nutzen, könnte das vorliegende Modellsystem durchaus bei der Klärung allgemeiner zellbiologischer Fragen helfen. So könnten Kesv und Kcv eine wichtige Rolle dabei spielen, um die Bindemotive oder Bindungspartner zu ermitteln, die nach der Translation an den freien Ribosomen für die weitere Sortierung verantwortlich sind. Beide Proteine sind sich sehr ähnlich und unterliegen dennoch einer unterschiedlichen Sortierung. Bislang konnte in eukaryontischen Zellen noch nicht geklärt werden, wie oder von welchen Proteinen erkannt wird, dass ein Protein nach der Translation für die Mitochondrien bestimmt ist. Es ist zwar bekannt, dass die gebildeten Proteine Komplexe mit stabilisierenden Faktoren bilden, weil sie sich noch nicht in ihrer endgültigen Konformation befinden und so anfällig für Degradation und Aggregation sind. Bisher wurden jedoch

erst wenige solcher Faktoren nachgewiesen. Einzig für die Chaperone Hsp70 und Hsp90 konnten überzeugende Beweise für Wechselwirkungen mit mitochondrialen Proteinen im Cytosol gefunden werden. Woher die Chaperone die mitochondriale *targeting*-Information nehmen, konnte noch nicht gezeigt werden (Neupert und Herrmann, 2007). Durch seine geringe Größe und seine hohe Ähnlichkeit ist das Paar Kesv und Kcv potentiell ein geeignetes Mittel für die Ermittlung von Bindemotiven oder sogar zusätzlichen Stabilisierungsfaktoren. Solche Motive zu entdecken und auf andere Proteine zu übertragen, könnte einen weiteren wichtigen Beitrag zum Verständnis des *targetings* und der Sortierung von Proteinen in Eukaryonten leisten.

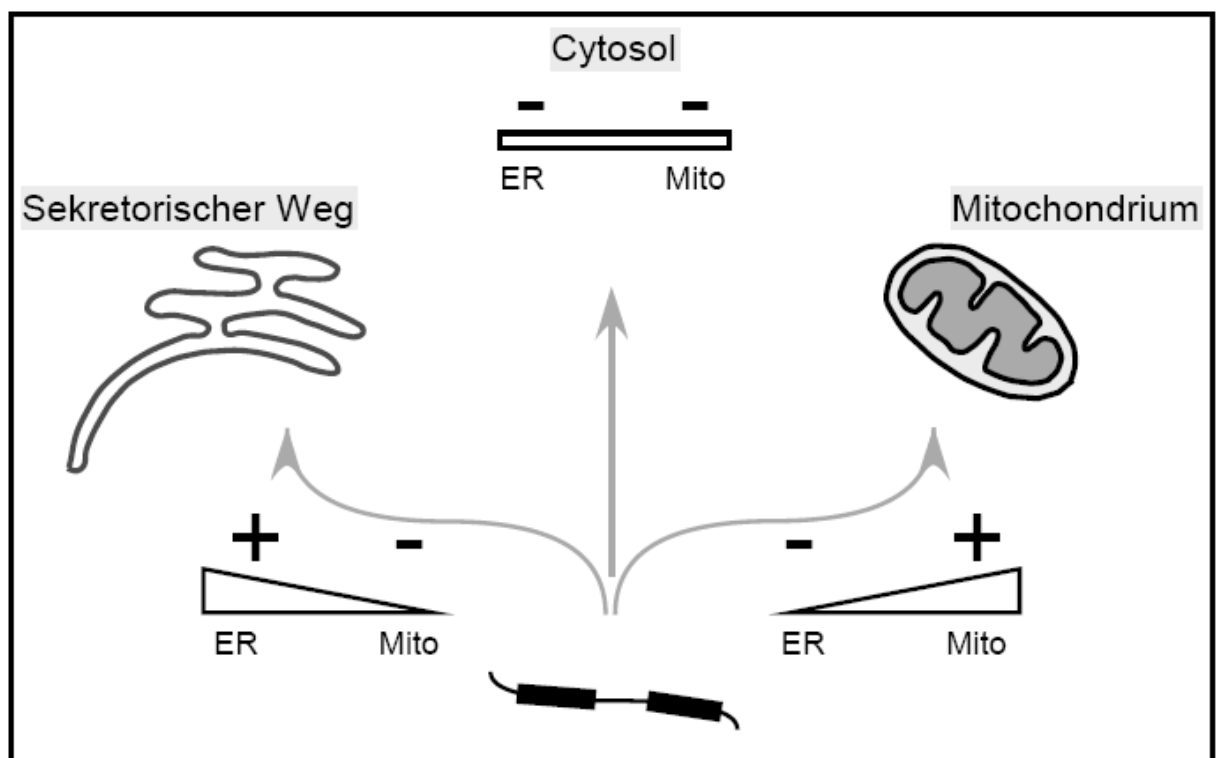


Abbildung 24: Modell zur Sortierung von Kesv und Mutanten. Je nach Stärke bzw. Schwäche der vorhandenen Signale wird das translatierte Protein zu einem von drei unterschiedlichen potentiellen Zielen geleitet.

4 Zusammenfassung

Einige Membranproteine, so auch Kaliumkanäle, sind sowohl in der Plasmamembran wie auch in den Membranen diverser Organellen lokalisiert. In manchen Fällen ist ein und dasselbe Protein oder ein Isoform eines Proteins in der Plasmamembran und in unterschiedlichen Zellkompartimenten einschließlich der Mitochondrien vorzufinden. Dieses so genannte *duale targeting* ist vor allem vor dem Hintergrund bemerkenswert, dass Proteine der Plasmamembran und der Mitochondrien fundamental unterschiedliche Synthesewege haben. Zurzeit sind die genauen Mechanismen und Abläufe, die zur Sortierung ähnlicher Membranproteine in unterschiedliche Zielkompartimente führen noch weitgehend unverstanden und Erkenntnisziel zahlreicher Studien.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei homologe virale Kaliumkanäle in heterologen Systemen wie Säugerzellen und Hefe einem unterschiedlichen *targeting* unterliegen. Aus der Analyse von Konfokalen-Laser-Mikroskopaufnahmen von HEK293 Zellen geht hervor, dass einer der beiden Kanäle, Kcv aus PBCV-1, in den sekretorischen Weg und zur PM gelangt, während der andere Kanal, Kesv aus EsV-1, in die Mitochondrien sortiert wird. Kesv trägt im N-Terminus eine typische mitochondriale Signalsequenz, die ein Reporterprotein (GFP) in die Mitochondrien leitet. Trotzdem benötigt Kesv dieses Signalpeptid nicht für seine Sortierung zu den Mitochondrien. Daher scheint ein weiteres dominantes Sortierungssignal im Protein enthalten zu sein. Vorhersagen über die Länge der Transmembrandomänen der untersuchten Kanäle deuten darauf hin, dass die zweite Membranhelix (TM2) von Kesv kürzer ist als die von Kcv. Verlängerungen der TM2 von Kesv mit mindestens einer Aminosäure führen dazu, dass das Kanalprotein nicht mehr in die Mitochondrien, sondern in den sekretorischen Weg sortiert wird. Als Folge des veränderten *targetings* konnte für einige Kesv-Mutanten, die in den sekretorischen Weg umgeleitet wurden, eine Kaliumkanalaktivität in der Plasmamembran in Hefekomplementationstest nachgewiesen werden.

Da lediglich eine Verlängerung im C-terminalen Abschnitt von TM2 dazu in der Lage ist, eine solche Veränderung im Sortieren von Kesv hervorzurufen, scheint die Länge von TM2 alleine nicht ausschlaggebend für das veränderte *targeting* zu sein. Eine weitere Analyse von Chimären, die aus unterschiedlich großen Fraktionen der zwei Proteine zusammengesetzt waren, zeigte ferner, dass die TM2 des Proteins nicht alleine ausschlaggebend für die Proteinsortierung ist: Vielmehr wirkt die TM2 nur im Kontext von großen Teilen des gesamten Proteins als Sortierungssignal.

Die gesammelten Daten lassen den Schluss zu, dass sowohl N- als auch C-terminale Bereiche im gefalteten Protein ein dreidimensionales Motiv bilden, das für das mitochondriale *targeting* verantwortlich ist. Bereits kleine strukturelle Veränderungen können bewirken, dass das *targeting* von Kesv von einer mitochondrialen Verteilung zu einer Sortierung in den sekretorischen Weg verändert wird. Da virale Proteine lediglich existierende zelluläre Mechanismen für ihre eigenen Bedürfnisse nutzen, ist anzunehmen, dass der hier gefundene Sortierungsvorgang auch für zelleigene Proteine relevant ist und dass somit kleinste strukturelle Unterschiede zwischen zwei Proteinen die Sortierung in unterschiedliche Zielkompartimente begründen.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien und Fluoreszenzfarbstoffe

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Fluka (Buchs, Schweiz) und Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) bezogen.

Die Fluoreszenzfarbstoffe Lysotracker® Red und MitoTracker® Red CMXRos wurden über Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

5.2 Sterilität

Lösungen, Nährmedien, Puffer, Einmalplastikmaterialien und Glasmaterial wurden 20 min in feuchter Hitze bei 1,5 bar/121°C autoklaviert. Die Sterilisation von Glaspipetten erfolgte über 4-5 h bei 180 °C im Trockenschrank. Thermolabile Lösungen und Puffer wurden durch Sterilfiltration (0,2 µm Filter; Schleicher & Schuell) entkeimt.

Arbeitsschritte der Zellkultur, sowie einige der Molekularbiologie, wurden mit Handschuhen unter einem Reinraumgerät durchgeführt, welches mit 80 % Ethanol und UV-Licht keimfrei gehalten wurde.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Enzyme

Verwendete Restriktionsendonukleasen wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) bezogen. Für die *site directed mutagenesis*-PCR wurden die *Pfu* DNA-Polymerase, die entsprechenden 10x Polymerase-Puffer und dNTPs von Promega (Mannheim) verwendet. Für die sonstigen PCR-Reaktionen wurde die *Taq* DNA Polymerase von Promega (Mannheim) oder NEB (Frankfurt a.M.) eingesetzt.

5.3.2 Größenstandards

FastRuler™ DNA ladder middle range (Fermentas, St. Leon-Rot)

GeneRulerTM 1kb DNA ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

5.3.3 Reaktionssysteme

GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

HiSpeedTM Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)

GenEluteTM High Performance Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

MinEluteTM Reaction Cleanup Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquickTM PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquickTM Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

5.3.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) wurden von Biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert.

Die Sequenzen der Primer und deren Verwendungszweck sind im Anhang aufgelistet.

5.3.5 Plasmide

5.3.5.1 pEGFP-N2 (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

pEGFP-N2 codiert für eine „red-shift“-Variante des Wildtyps des *Green Fluorescent Protein* (GFP). GFP ist ein Protein der Qualle *Aequorea victoria*, das bei entsprechender Anregung fluoresziert. Es dient in dieser Arbeit als Marker für die Genexpression und für die Lokalisationsstudien. Sämtliche Konstrukte wurden zwischen die Schnittstellen BglII und EcoRI in die *multiple cloning site* (MCS) kloniert.

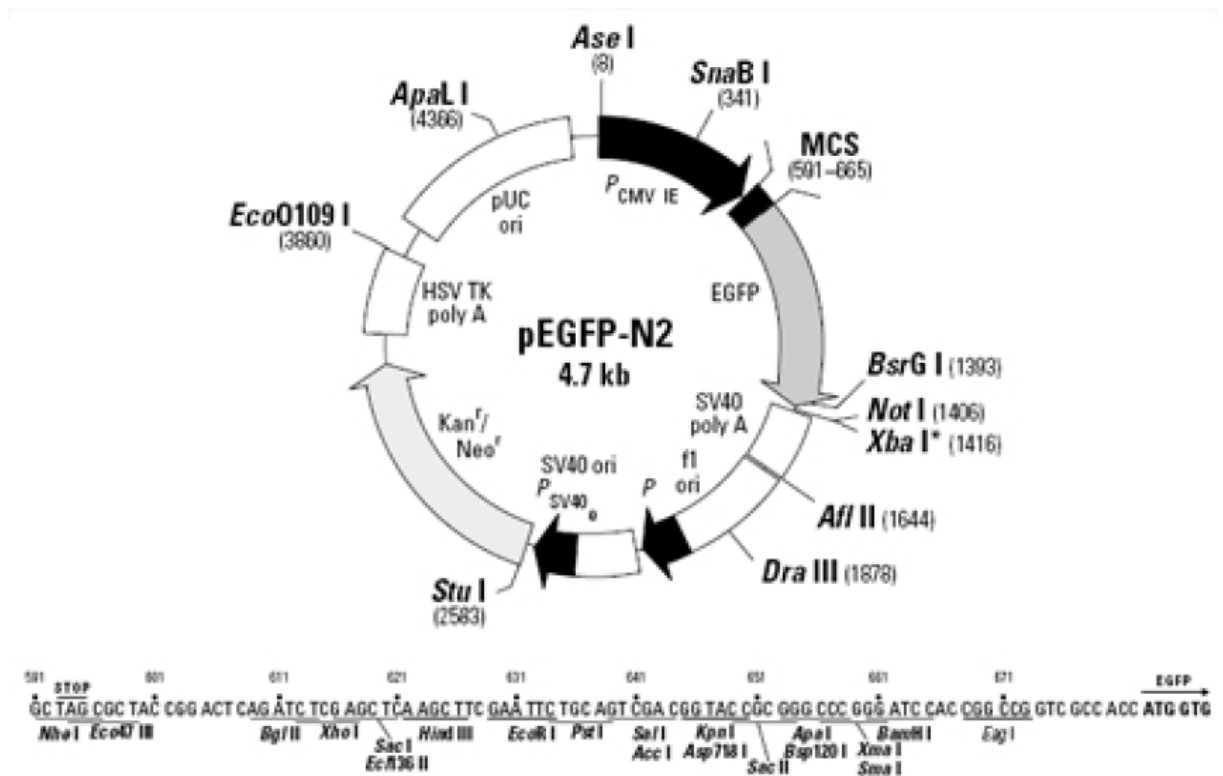


Abb. 25: Plasmidkarte von pEGFP-N2 mit genauem Ausschnitt der MCS.

5.3.5.2 pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe)

Zur Expression von Konstrukten, die nicht als Fusionsprotein mit GFP vorliegen sollten, wurde der Vektor pcDNA3 verwendet. Sämtliche Konstrukte wurden zwischen die Schnittstellen BamHI und XhoI in die *multiple cloning site* (MCS) kloniert.

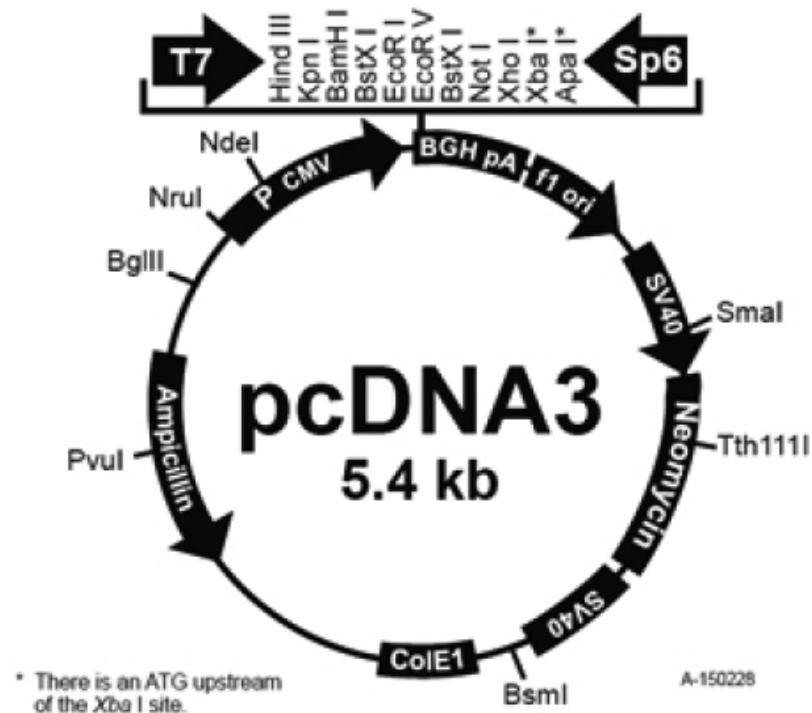


Abb. 26: Plasmidkarte von pcDNA3 mit genauem Ausschnitt der MCS.

5.3.5.3 pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe)

Der verwendete Vektor wurde freundlicherweise von Dan Minor (San Francisco) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Version des pYES2-Vektors von Invitrogen (Karlsruhe).

Der Originalvektor wurde an folgenden Stellen modifiziert:

- die PvuI-Schnittstelle an Position 2516 wurde entfernt und durch die Sequenz 5'-GTAGGATCG-3' ersetzt
- ebenfalls wurde die PvuI-Schnittstelle an Position 4417 entfernt und durch die Sequenz 5'-CAACGATTGGAG-3' ersetzt
- der GAL1-Promotor wurde herausgeschnitten und durch einen Met25-Promoter ersetzt. Durch diese Veränderung wird die Expression des rekombinanten Proteins durch die Anwesenheit von Methionin reprimiert.

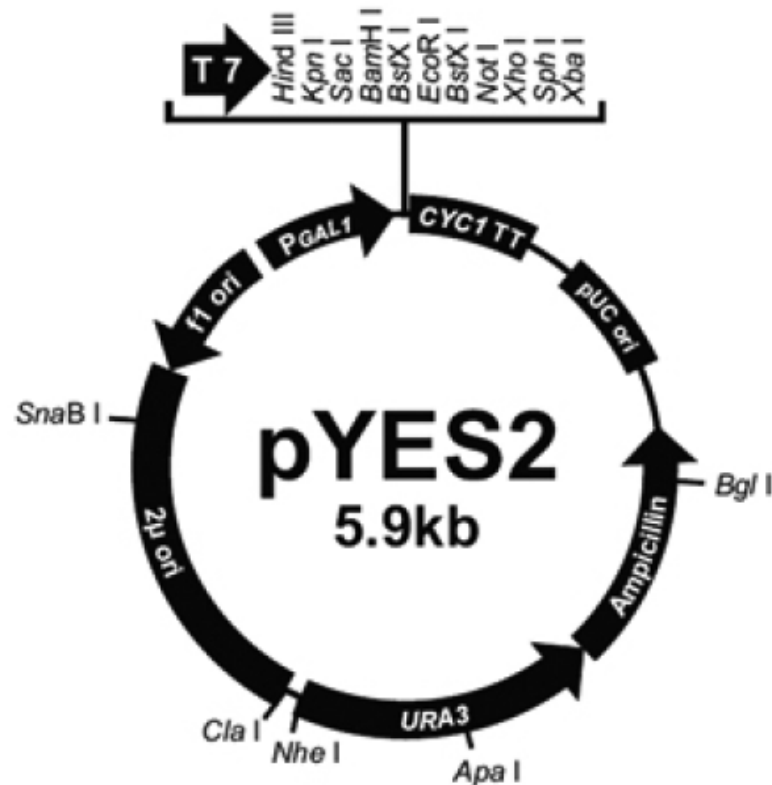


Abb. 27: Plasmid pYES2 mit MCS und deren Restriktionsschnittstellen (Invitrogen).

5.3.6 Konstrukte

Eine Auflistung sämtlicher hergestellter Konstrukte ist im Anhang zu finden.

5.3.7 Heterologe Expressionssysteme

Für die Expression der verschiedenen Plasmide wurden unterschiedliche heterologe Expressionssysteme verwendet. Bei den Expressionssystemen handelt es sich um Säugerzellen, Pflanzenzellen und Hefen.

5.3.7.1 Human Embryonal Kidney Cells (HEK293)

Die eukaryontische Zelllinie „Human Embryonal Kidney Cells“ (HEK293) wurde durch Einbringen gescherter Adenovirus-DNA in embryonale menschliche Nierenzellen hergestellt (Graham *et al.*, 1977). Sie wurden in Rahmen dieser Arbeit zur transienten Expression der verschiedenen pEGFP-Konstrukte verwendet. Die Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10 % (v/v) FCS, 2,5 mM Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-begasteten Brutschrank (Heraeus) unter standardisierten Be-

dingungen von 37°C und 5 % CO₂.

5.3.7.2 Hefestamm SGY1528 (aus W303)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hefestamm SGY1528 (Tang *et al.*, 1995) verwendet. Auch der Hefestamm wurde freundlicherweise von Dan Minor (San Francisco) zur Verfügung gestellt.

<i>S. cerevisiae</i>	Genotyp	Herkunft
SGY1528	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 trk1::HIS3 trk2::TRP1</i>	D. Minor (San Francisco)

5.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurden verschiedene Varianten der Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Zum einen die *site directed mutagenesis* zur gezielten Mutagenese oder zur Insertion bestimmter Aminosäuren in die Kanalproteine, die Standard-PCR zur Amplifikation verschiedener Kanalproteine zur Klonierung in einen anderen Vektor und die Kolonie-PCR zur Kontrolle der richtigen Orientierung des eingefügten Fragments nach der Ligation. Des Weiteren die Homologie-PCR, die zur Erstellung der Chimärenproteine verwendet wurde.

5.3.8.1 Site directed mutagenesis (SDM-PCR)

Durch die *site directed mutagenesis* können Basen in einer DNA-Sequenz leicht eingefügt, mutiert und entfernt werden. Dazu werden Primer hergestellt, in denen die gewünschte Veränderung enthalten ist. Diese werden dann in einer PCR eingesetzt. Das verwendete Protokoll wurde in Anlehnung an die Anleitung des *QuikChange™ site directed mutagenesis* Kit von Stratagene erstellt.

PCR-Programm:

Denaturierungsphase: 95°C, 5 min

Denaturierung: 95°C, 30 s

Annealing: 55°C, 1 min

Elongation: 68°C, 11-13 min (Elongationszeit je nach Plasmidgröße)

Der Zyklus (Denaturierung, Annealing und Elongation) wurde 18mal wiederholt

Elongation: 68°C, 5 min

PCR-Ansatz (50 µl):

5 µl Reaktionspuffer [10x]

1 µl Plasmid-DNA Template [30 ng/µl]

1,25 µl Primer forward [100 ng/µl]

1,25 µl Primer reverse [100 ng/µl]

1 µl dNTP-Mix [10 mM je dNTP]

1 µl *Pfu*-Polymerase [3 U/µl]

ad 50 µl ddH₂O

Auf die PCR folgte anschließend ein Verdau des PCR-Ansatzes um die methylierte, nicht mutierte template-DNA abzubauen. Dazu wurden die PCR-Produkte mit 10 U DpnI für 1 h bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine Hitze-Schock Transformation mit 1 µl des verdauten PCR-Ansatzes.

5.3.8.2 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde verwendet um Kanalproteine in verschiedene Vektoren zu klonieren. Je nach dem zu amplifizierenden Fragment und Vektor mussten unterschiedliche Primer hergestellt werden, die unterschiedliche Schnittstellen tragen.

PCR-Programm:

Denaturierungsphase: 95°C, 5 min

Denaturierung: 95°C, 30 s

Annealing: 45-55°C, 45 s

Elongation: 68°C, 45 s (Elongationszeit je nach Fragmentgröße)

Der Zyklus (Denaturierung, Annealing und Elongation) wurde 30mal wiederholt

Elongation: 68°C, 5 min

PCR-Ansatz (50 µl):

5 µl Reaktionspuffer [10x]

3 µl Magnesiumchlorid

1 µl Plasmid-DNA Template [30 ng/µl]
1 µl Primer forward [1 pmol/µl]
1 µl Primer reverse [1 pmol/µl]
1 µl dNTP-Mix [10 mM je dNTP]
0,5 µl *Taq*-Polymerase
ad 50 µl ddH₂O

5.3.8.3 Chimären-PCR

Mit Hilfe dieser Variante der PCR können Chimären-Proteine hergestellt werden. Im Folgenden soll der Ablauf in der Chimären-PCR anhand des Schemas in Abbildung 28 kurz erläutert werden.

Der gewünschte DNA-Abschnitt des ersten Proteins wurde mit dem Primerpaar (P1 und P2), der DNA-Abschnitt des zweiten Proteins mit dem Primerpaar (P3 und P4) unter Verwendung eines Standard-PCR-Protokolls amplifiziert. Die Primer P1 und P4 enthielten jeweils Restriktionsschnittstellen und Primer P3 einen homologen Abschnitt der DNA-Sequenz des ersten Proteins. Die PCR-Produkte der beiden Reaktionen wurden über eine Gelelektrophorese auf die richtige Größe getestet und mittels eines DNA-Gelextraktionskits gereinigt. Die beiden gereinigten PCR-Produkte wurden als Template in einen neuen PCR-Ansatz mit den Primern P1 und P4 eingesetzt. Das resultierende PCR-Produkt wurde wieder mittels einer Gelelektrophorese auf die richtige Größe kontrolliert und aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde das extrahierte PCR-Produkt mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, der Verdau mit einem PCR CleanUp Kit gereinigt und in die Ligation eingesetzt.

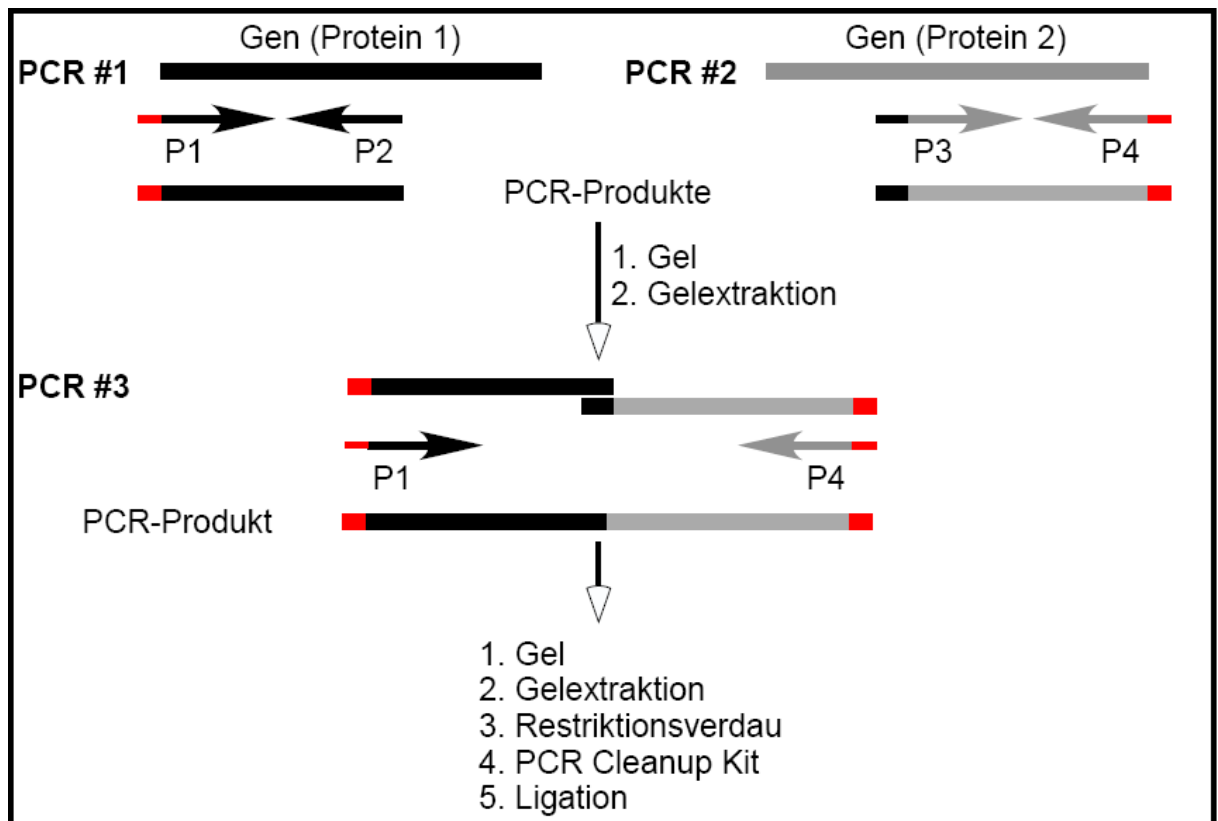


Abbildung 28: Schematischer Ablauf der Chimären-PCR; die Chimären-PCR besteht aus drei unabhängigen PCR-Reaktionen. Verwendet werden vier Primer. Die Primer P1 und P4 enthalten die gewünschten Restriktionschnittstellen (rot). Der Primer 3 enthält einen homologen Abschnitt des ersten Proteins (schwarz), damit sich in der dritten PCR-Reaktion die beiden PCR-Produkte der ersten beiden Reaktionen aneinander lagern.

5.3.8.4 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde durchgeführt um nach der Ligation eines Fragments zu kontrollieren, ob die Ligation erfolgreich war. Dazu wurden die Primer so ausgewählt, dass ein Primer im Plasmid und der zweite im zu ligierenden Insert binden konnten. Dadurch wurde gewährleistet, dass nur ein Produkt bei erfolgreicher Ligation entstehen konnte.

Für die Kolonie-PCR wird das Standard-PCR-Protokoll verwendet. Lediglich der PCR-Ansatz ist abgewandelt.

PCR-Ansatz (25 µl):

2,5 µl Reaktionspuffer [10x]

1,5 µl Magnesiumchlorid

1 µl Primer forward [1 pmol/µl]
1 µl Primer reverse [1 pmol/µl]
1 µl dNTP-Mix [10 mM je dNTP]
0,25 µl *Taq*-Polymerase
ad 25 µl ddH₂O

Als Template wird eine gepickte Kolonie in den PCR-Ansatz getaucht und kurz auf und ab gezogen.

5.3.9 Ligation

Durch eine Ligation können ein zuvor amplifiziertes DNA-Fragment und ein linearisiertes Plasmid, welche mit Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, verbunden werden.

Folgender Ligationsansatz wurde standardmäßig verwendet:

2 µl Reaktionspuffer [10x]
1 µl T4 DNA-Ligase [400 U/µl]
Linearisiertes Plasmid [25 ng/µl]
Geschnittenes Fragment [125 ng/µl]
ad 20 µl ddH₂O

Der Ansatz wurde für 4 h bei 16°C inkubiert und danach für 15 min bei 65°C inaktiviert. Durch das Erhitzen wird der DNA-Ligase-Komplex zerstört und die Aufnahmewahrscheinlichkeit der ligierten DNA bei der Hitzeschocktransformation erhöht.

5.3.10 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der *E. coli*-Stamm wurde im Medium nach Luria und Bertani (Bertani 1952) kultiviert. Durch Zugabe von Antibiotika in das Medium konnten selektive Bedingungen erzeugt werden. Für das Wachstum auf Agarplatten wurde das Flüssigmedium mit 15 g/l Agar versetzt. Die Bakterien-Stammkulturen, die als Glycerinsuspension (58 %) bei -70°C lagerten, wurden bei Bedarf auf LB-Agarplatten (plus Antibiotikum) mit einer Impföse ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelkolonien dieser Übernachtskulturen wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

5.3.11 Hitzeschocktransformation

Etwa 5×10^7 kompetente XL1 *E. coli* Zellen (in 50 μ l Zellsuspension, nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan 1985) hergestellt) wurden auf Eis aufgetaut und dann mit 1-4 μ l DNA aus der Ligation oder dem DpnI-Verdau vermischt. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurde ein Hitzeschock für 1-2 min bei 42°C durchgeführt. Danach wurde der Mix 2 min in Eis abgekühlt und 250 μ l SOC-Medium (20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM Glucose) zugesetzt. Dieser Ansatz wurde nun auf dem Schüttler für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Platten mit dem benötigten Antibiotikum (Ampicillin 100 mg/l; Kanamycin 50 mg/l) ausgestrichen und über Nacht im Hitzeschränk bei 37°C belassen.

5.3.12 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde im kleinen Maßstab mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma nach Vorschrift durchgeführt. Abweichend zur Vorschrift wurde die DNA mit 50 μ l ddH₂O eluiert.

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das GenElute™ Plasmid Midi Kit nach Vorschrift angewendet. Hier wurden zweimal je 300 μ l ddH₂O zur Elution der Plasmid-DNA verwendet.

5.3.13 DNA-Quantifizierung

Die Konzentrationen wässriger DNA-Lösungen wurden spektralphotometrisch anhand der Absorption von Licht bei 260 nm ermittelt (Nano-Drop ND-1000 Spektralphotometer, peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Dabei wurde eine optische Dichte (OD 260 nm) von 1 einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA gleichgesetzt. Die Reinheit der Lösung wurde durch das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt. Ein Verhältnis von über 1,8 gilt als Maß für eine geringe Verunreinigung durch Proteine (Sambrook et al., 1989).

5.3.14 DNA Sequenzierung

Sämtliche DNA-Konstrukte wurden durch Sequenzierungen auf Richtigkeit kontrolliert. Diese wurden bei der Firma SeqLab (Göttingen) in Auftrag gegeben. Durch Wahl des jeweiligen

Primers konnte der entsprechende Bereich der Plasmid-DNA analysiert werden.

5.3.15 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden geladene Teilchen mit unterschiedlicher Ladung und Größe in einem elektrischen Feld mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe, Masse und Form der Moleküle ab. Hierbei wandern die geladenen Nukleinsäuren, die über einen sehr großen pH-Bereich negativ geladen sind, in Richtung Anode. Ladungsträger der Negativ-Ladung sind dabei die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der Nukleinsäuren. Die Gelelektrophorese dient hier der qualitativen und quantitativen Analyse von DNA. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele mit 2 µl Ethidiumbromid 1:10000 (w/v) versetzt. Ein wichtiges Hilfsmittel zur Charakterisierung der Fragmentgrößen sind die Größenstandards, die DNA-Fragmente mit genau definierten Größen enthalten. Als Trägermaterial wurde Agarose verwendet; in den meisten Fällen wurde 1 % in 1x TAE-Puffer gelöst. Gelläufe erfolgten bei 100 V für 45 min.

5.3.16 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von DNA bzw. zu ihrem gezielten Abbau dienten spezifisch spaltende Restriktionsenzyme. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den diesbezüglichen Vorschriften der Herstellerfirmen (New England Biolabs, Promega).

5.3.17 Transfektion von CHO-K1- und HEK293-Zellen

Die Transfektion ist eine Methode zur Einschleusung von Fremd-DNA in Eukaryontenzellen. Mit Hilfe dieser Methode konnten die zu untersuchenden Konstrukte in den Zellen heterolog exprimiert werden. Dazu wurde das Reagenz Metafectene (Biontex, München) den Herstellerangaben gemäß verwendet.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Antikörper

5.4.1.1 Primärantikörper

Anti-HA (16B12) *mouse monoclonal antibody*, HA.11 (Covance Research Products, Inc, Berkeley).

5.4.1.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor® 488 *goat anti-mouse* IgG (H+L), (Invitrogen, Karlsruhe).

5.4.2 Immunolokalisation

Auf Deckgläschen angewachsene HEK293-Zellen wurden herangezogen um Kanalproteine, die mit einem HA-Tag markiert sind, zu lokalisieren. Dazu wurden die HEK-Zellen mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden nach etwa 24 h mit 300 nM MitoTracker Red CMXRos für 30 min inkubiert und danach bei 4°C 15 min fixiert (4 % Paraformaldehyd in PBS). Die fixierten Zellen wurden mit 0,1 % Triton-X 100 in PBS für 5 min permeabilisiert. Zum Blocken unspezifischer Bindestellen wurden die Zellen für 15 min in Blocklösung (0,5 g BSA auf 100 ml PBS) inkubiert. Der Primärantikörper (anti-HA) wurde 1:1000 in Blocklösung verdünnt und für 1 h auf die Zellen gegeben. Zur Entfernung des Primärantikörpers wurden die Zellen viermal für 5 min mit Blocklösung gewaschen. Der Sekundärantikörper (Alexa 488) wurde in einer 1:100 Verdünnung verwendet. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen wieder gewaschen. Die getrockneten Deckgläschen wurden mit Kaisers Gelatine auf Objektträgern befestigt.

5.4.3 Brefeldin A- Assay

Die Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 4 h mit 18 µM Brefeldin A und 100 µg/ml Cycloheximid inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch Medium mit 300 µM Cycloheximid ersetzt. Jeweils 30 min vor den Probenahmen wurde dem Medium 300 nM MitoTracker Red CMXRos zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zu drei unterschiedlichen Punkten wurden Proben genommen: 24 h nach der Transfektion, nach der

vierstündigen Inkubation mit Brefeldin A und Cycloheximid und nach der vierstündigen Inkubation mit Cycloheximid.

5.4.4 Isolierung von Mitochondrien aus HEK293-Zellen

Zur Isolation von Mitochondrien wurden die Zellen für 30 min bei 4°C in einer Lösung aus 0,3 M Saccharose, 10 mM TES (pH 7,4) und 0,5 mM EGTA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Dounce-Homogenisator in ca. 40 Stößen homogenisiert. Zellkerne und nicht zerstörte Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 600 g für 5 min bei 4°C pelletiert. Die Überstände wurden erneut zentrifugiert (6000 g, 10 min, 4°C) und die pelletierten Mitochondrien mit Hilfe einer Percoll-Gradienten-Zentrifugation (8500 g, 10 min, 4°C) weiter gereinigt. Es wurden Percoll Konzentrationen von 60 %, 30 % und 18 % im oben genannten Puffer verwendet. Die Mitochondrien wurden an der Interphase zwischen 30 % und 60 % aufgenommen und in einem weiteren Puffer (50 mM PIPES-KOH (pH 7, 4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 2 mM ATP, 10 mM Succinat, 50 µg/ml Keatinkinase und 10 µg/ml Proteaseinhibitormix) gelöst.

5.5 Hefekomplementationstests

5.6 Lösungen und Medien für Hefekomplementation

YPD(A)-Medium 50K

(Herstellung kompetenter Hefen)

10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Bactopepton
20 g/l Glucose
100 mg/l Adeninsulfat
50 mM KCl

Für Agar-Platten: 2 % Agar

SD (-ura)+A+50K-Medium

(Selektionsmedium zur Anzucht transformierter Hefen)

26,7 g/l SD-Base
0,77 g/l Supplement(-ura)
0,1 g/l Adeninsulfat

50 mM KCl
pH mit KOH auf 5,5 einstellen

Für Agar-Platten: 2 % Agar

100 mM KCl-non selective plates

(nicht-selektive Kontrollplatten)

20 g/l Bacto-Agar
1,5 g/l Supplement (-ura/-met)
6,7 g/l Yeast Nitrogen Base (without amino-acid)
100 mM KCl
20 g/l Glucose
pH mit FreeTrisBase auf 6,5 einstellen

1 mM KCl selective plates

15 g/l Agarose (Sigma purified Agar)
1,5 g/l Supplement (-ura/-met)
2,1 g/l Arginine Base
1 mM KCl
10 g/l Glucose
1 mM MgSO₄
0,1 mM CaCl₂
0,5 ml Vitaminlösung
0,5 ml Spurenelementlösung
pH mit Phosphorsäure auf 6 einstellen

0,5 mM KCl-non selective plates

15 g/l Agarose (Sigma purified Agar)
1,5 g/l Supplement (-ura/-met)
2,1 g/l Arginine Base
0,5 mM KCl
10 g/l Glucose
1 mM MgSO₄
0,1 mM CaCl₂
0,5 ml Vitaminlösung
0,5 ml Spurenelementlösung

pH mit Phosphorsäure auf 6 einstellen

10x LiAc

1 M LiAc

10x TE

100 mM TrisCl

10 mM EDTA

1x LiAc/TE-Lösung

1 ml 10x LiAc

1 ml 10x TE

8 ml ddH₂O

LiAc/TE/Glycerin-Lösung

1 ml 10x LiAc

1 ml 10x TE

1,5 ml Glycerin (99 %)

6,5 ml ddH₂O

50 %ige PEG-Lösung

4 g Polyethylenglykol (PEG) 4000

1 ml ddH₂O

PEG/LiAc/TE-Lösung

8 ml 50 %ige PEG-Lösung

1 ml 10x TE

1 ml 10x LiAc

steril filtrieren

Spurenelementlösung (Rezept für 100 ml)

Borsäure 0,05 g

CuSO₄ 0,004 g

KI 0,01 g

FeCl₃ 0,05 g

MnSO₄ 0,04 g

Molybdänsäure 0,09 g

ZnSO₄ 0,04 g

konz. Salzsäure 1 ml

Vitaminlösung (Rezept für 100 ml)

Biotin	100x Stammlösung: 0,02 g in 100 ml
D-Pantothensäure	0,04 g
Nicotinsäure	0,04 g
Pyridoxin	0,04 g
Thiamon	0,04 g
Inositol	0,2 g

5.6.1 Kultivierung von Hefezellen**5.6.1.1 Herstellen einer Hefevorkultur**

Vorkulturen werden entweder aus Glycerinkulturen oder Agarplatten angeimpft. Beim Animpfen der Vorkulturen von Agarplatten, wird mit einem sterilen Zahnstocher eine Kolonie gepickt und in ein Reagenzglas mit dem entsprechenden Flüssigmedium überführt. Zum Animpfen aus den Glycerinkulturen wurden die Glycerinstocks aufgetaut und anschließend 10-50 µl des Stocks in die Reagenzgläser mit den entsprechenden Medien überführt.

5.6.1.2 Herstellung kompetenter Hefen mit der LiAc-Methode

Ein Reagenzglas mit 10 ml YPD(A)+50K-Flüssigmedium wird mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 30°C und 200 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert. Diese Starterkultur kann bei 4°C bis zu 4 Wochen aufgehoben werden.

Zur Herstellung der kompetenten Hefen werden in einem Erlenmeyerkolben 50 ml YPD(A)+50K-Flüssigmedium vorgelegt und mit 3 µl (das Volumen von 3 µl ist ideal für einen Wachstumszeitraum von 18.00 Uhr bis 8.30 Uhr am nächsten Morgen) der Starterkultur angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 30°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Die OD₆₀₀ sollte am Morgen zwischen 0,8 und 1,0 liegen.

Anschließend wird die Zellsuspension auf je 2 sterile 25 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 6 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das Pellet in je 8 ml (1/3 des Ausgangsvolumens) steriler LiAc/TE-Lösung resuspendiert. Es folgt eine Zentrifugation für 6 min bei 4000 rpm. Das erhaltene Pellet wird in jeweils 0,25 ml steriler LiAc/TE-Lösung (1/100 des Ausgangsvolumens) resuspendiert und anschließend werden jeweils zwei Ansätze in einem 1,5 ml Eppi zusammengeführt und für 1 h bei 30°C und 75 rpm inkubiert. Die kompetenten Hefezellen müssen die Hefezellen bei -80°C tiefgefroren werden.

5.6.1.3 Transformation der Hefen nach der LiAc-Methode

Zunächst werden kompetente Hefen langsam auf Eis aufgetaut. Heringssperma-DNA wird in einem Thermoblock 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die denaturierte Heringssperma-DNA wird in sterilen Eppis vorgelegt und entsprechende Volumina an pDNA zupipettiert. Jeder Ansatz sollte 1 µg pDNA enthalten. Anschließend werden jeweils 100 µl kompetente Hefezellen zugegeben und gemischt. Des Weiteren werden 0,6 ml frisch angesetzte und sterile PEG/LiAc/TE-Lösung zugegeben, kurz gevortext und bei 30°C und 200 rpm für 30 min inkubiert.

Für den Hitzeschock werden die Eppis 15 min bei 42°C in den Thermoblock gestellt und im Anschluss direkt für 3 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert, um das Pellet in 0,3 ml 1x TE-Puffer resuspendieren zu können. Von jedem Ansatz werden 150 µl in die Mitte einer SD (-ura)+A+50K-Agarplatte aufgebracht und mit dem Drigalsky-Spatel ausplattiert.

Die Platten werden für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert bis Kolonien gewachsen sind. Im Anschluss werden von den transformierten Hefen Stocks angefertigt. Dazu wird mit sterilen Zahnstochern von jeder Platte jeweils eine Kolonie gepickt und in sterile Reagenzgläser mit Überfallkappe mit 10 ml SD(-ura)+A+50K-Flüssigmedium überimpft. Diese Kultur wird für 3-4 Tage bei 30°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert.

5.6.1.4 Hefekomplementationstest

Da die Vorkulturen in der Regel sehr langsam wachsen, werden die kompletten Proben in sterile Falcons überführt und bei 4000 rpm zentrifugiert (sollte eine Probe ein besseres Wachstum aufweisen, reicht es aus, 1 ml in ein Eppi zu überführen und bei 4000 rpm zu zentrifugieren). Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml H₂O-Bidest resuspendiert. Die Probe wird erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird nochmals in 1 ml H₂O-Bidest resuspendiert und abzentrifugiert um letzte Mediumrückstände auszuwaschen. Für den Tröpfchentest wird die OD₆₀₀ mit dem Nano-Drop auf ca. 1 eingestellt und daraus werden Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 mit H₂O-Bidest hergestellt. Die Verdünnungen werden gründlich gevortext und je 7 µl, nach dem in der unteren Abbildung dargestellten Muster, auf die Platten mit 100 mM (nicht-selektive Platte), 1 mM (selektive Platte) und 0,5 mM KCl (selektive Platte) aufgetragen. Die Platten werden für ca. 3 Tage bei 30°C inkubiert.

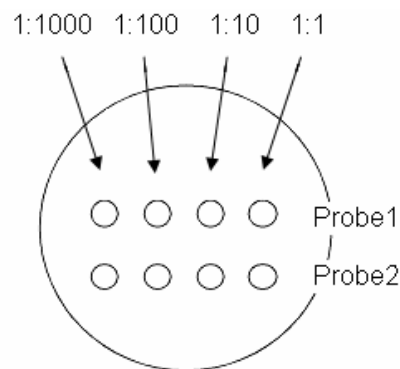


Abb. 29: Auftragungsmuster für den Hefekomplementationstest.

5.7 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Das Leica TCS SP System (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg) wurde zur Aufnahme sämtlicher Lokalisationbilder verwendet. Das System ist ausgerüstet mit einem inversen Mikroskop (DM-IRBE), einem konfokalen Scanner (TCS NT/SP), einem 25 mW Argon-Krypton-Laser mit den Wellenlängen 458, 476, 488, und 514 nm und einem Helium-Neon-Laser mit den Wellenlängen 543 und 633 nm. Die Bilder wurden mit einem HCX PL APO 63x/1,2 NA Objektiv aufgenommen.

Für die Aufnahmen wurden die Zellen in Glas Boden-Petrischalen (MaTek, Ashland, USA) angezogen und 24 h nach der Transfektion mit 300 nM MitoTracker Red CMXRos für 30 min inkubiert. Das GFP wurde mit der 488 nm Argon-Laserlinie angeregt und die Emission bei 505 bis 555 nm aufgenommen. Zur Anregung des MitoTracker Red CMXRos wurde der Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 543 nm verwendet.

5.8 Software und Internetadressen

Zur Auswertung und Analyse wurden Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA), Leica Confocal Software Lite 2.61 (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg) und ImageJ 1.38w (W. Rasband, freie Software) verwendet.

Folgende verwendete Algorithmen sind im Internet frei verfügbar:

MitoProt II

<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>

pSORT und pSORT II

<http://psort.nibb.ac.jp>

TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP
TMHMM 1.0 und 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM
TMHMMfix	http://www.sbc.su.se/~melen/TMHMMfix

5.9 Genbanknummern

Das Genom von *Ectocarpus siliculosus* Virus (EsV-1) ist unter der GenBank Nummer NC_002687 eingetragen. Die Sequenz von ORF 223 (Kev) ist unter AAK14637 zu finden. Das *Paramecium bursaria Chlorella*-Virus (PBCV-1)-Genom ist unter NC_000582 eingetragen. Die Sequenz von ORF a250r (Kcv) hat die Zugangsnummer AY3382212.

6 Literaturverzeichnis

- Addya, S., Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Bhagwat, S. V., Mullick, J., & Avadhani, N. G. (1997). Targeting of NH₂-terminal-processed Microsomal Protein to Mitochondria: A Novel Pathway for the Biogenesis of Hepatic Mitochondrial P450MT2. *J. Cell Biol.*, 139(3), 589-599.
- Ahting, U., Waizenegger, T., Neupert, W., & Rapaport, D. (2005). Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 280(1), 48-53.
- Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Robin, M., & Avadhani, N. G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 161(1), 41-54.
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J., & Gaber, R. F. (1992). Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in Saccharomyces cerevisiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9), 3736-40.
- Bandlow, W., Strobel, G., & Schricker, R. (1998). Influence of N-terminal sequence variation on the sorting of major adenylate kinase to the mitochondrial intermembrane space in yeast. *The Biochemical journal*, 329 (Pt 2), 359-67.
- Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends in cell biology*, 13(6), 295-300.
- Bauer, M. F., Hofmann, S., Neupert, W., & Brunner, M. (2000). Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends in cell biology*, 10(1), 25-31.
- Bisson, M. A., & Kirst, G. O. (1995). Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. *Naturwissenschaften*, 82(10), 461-471. Abgerufen November 12, 2007, von <http://dx.doi.org/10.1007/BF01131597>
- Borgese, N., Brambillasca, S., & Colombo, S. (2007). How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(4), 368-375.
- Brandizzi, F., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J., & Paris, N. (2002). The Destination for Single-Pass Membrane Proteins Is Influenced Markedly by the Length of the Hydrophobic Domain. *Plant Cell*, 14(5), 1077-1092.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán Szklarz, L. K., Schulze-Specking, A., u. a. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO journal*, 23(19), 3735-46.
- Chen, J., Cassar, S. C., Zhang, D., & Gopalakrishnan, M. (2005). A novel potassium channel encoded by Ectocarpus siliculosus virus. *Biochemical and biophysical research communications*, 326(4), 887-93.

- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., u. a. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature medicine*, 7(12), 1306-12.
- Chew, O., Rudhe, C., Glaser, E., & Whelan, J. (2003). Characterization of the targeting signal of dual-targeted pea glutathione reductase. *Plant molecular biology*, 53(3), 341-56.
- Claros, M. G., & Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European journal of biochemistry / FEBS*, 241(3), 779-86.
- Colombo, S., Longhi, R., Alcaro, S., Ortuso, F., Sprocati, T., Flora, A., u. a. (2005). N-myristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b5 reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning. *The Journal of cell biology*, 168(5), 735-45.
- Danpure, C. J. (1995). How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? *Trends in cell biology*, 5(6), 230-8.
- Delaroque, N., Maier, I., Knippers, R., & Müller, D. G. (1999). Persistent virus integration into the genome of its algal host, *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *The Journal of general virology*, 80 (Pt 6), 1367-70.
- Doherty, A. J., Håkansson, K., Ho, C. K., Shuman, S., & Wigley, D. B. (1997). Crystallization of the RNA guanylyltransferase of Chlorella virus PBCV-1. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 53(Pt 4), 482-4.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., u. a. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5360), 69-77.
- Egner, U., Tomasselli, A. G., & Schulz, G. E. (1987). Structure of the complex of yeast adenylate kinase with the inhibitor P₁P₅-di(adenosine-5'-)pentaphosphate at 2.6 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 195(3), 649-58.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of molecular biology*, 300(4), 1005-16.
- Endo, T., & Kohda, D. (2002). Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochimica et biophysica acta*, 1592(1), 3-14.
- Fortune, J., Dickey, J., Lavrukhin, O., Van Etten, J., Lloyd, R., & Osheroff, N. (2002). Site-Specific DNA Cleavage by Chlorella Virus Topoisomerase II. *Biochemistry*, 41(39), 11761-11769.
- Fortune, J. M., Lavrukhin, O. V., Gurnon, J. R., Van Etten, J. L., Lloyd, R. S., & Osheroff, N. (2001). Topoisomerase II from Chlorella Virus PBCV-1 Has an Exceptionally High DNA Cleavage Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24401-24408.
- Gazzarrini, S., Abenavoli, A., Gradmann, D., Thiel, G., & Moroni, A. (2006). Electrokinetics of miniature K⁺ channel: open-state V sensitivity and inhibition by K⁺ driving force. *The Journal of membrane biology*, 214(1), 9-17.

- Gazzarrini, S., Kang, M., Van Etten, J. L., Tayefeh, S., Kast, S. M., DiFrancesco, D., u. a. (2004). Long distance interactions within the potassium channel pore are revealed by molecular diversity of viral proteins. *The Journal of biological chemistry*, 279(27), 28443-9.
- Gibbs, J. S., Malide, D., Hornung, F., Bennink, J. R., & Yewdell, J. W. (2003). The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *Journal of virology*, 77(13), 7214-24.
- Gould, S. G., Keller, G. A., & Subramani, S. (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *The Journal of cell biology*, 105(6 Pt 2), 2923-31.
- Graf, S. A., Haigh, S. E., Corson, E. D., & Shirihai, O. S. (2004). Targeting, import, and dimerization of a mammalian mitochondrial ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB10 (ABC-me). *The Journal of biological chemistry*, 279(41), 42954-63.
- Griffin, S. D. C., Harvey, R., Clarke, D. S., Barclay, W. S., Harris, M., & Rowlands, D. J. (2004). A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *The Journal of general virology*, 85(Pt 2), 451-61.
- Halic, M., & Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Current opinion in structural biology*, 15(1), 116-25.
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS letters*, 418(3), 367-70.
- Hell, K., Neupert, W., & Stuart, R. A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *The EMBO journal*, 20(6), 1281-8.
- Hertel, B., Tayefeh, S., Mehmel, M., Kast, S. M., Van Etten, J., Moroni, A., u. a. (2006). Elongation of outer transmembrane domain alters function of miniature K⁺ channel Kcv. *The Journal of membrane biology*, 210(1), 21-9.
- Hettema, E. H., Ruigrok, C. C., Koerkamp, M. G., van den Berg, M., Tabak, H. F., Distel, B., u. a. (1998). The cytosolic DnaJ-like protein djplp is involved specifically in peroxisomal protein import. *The Journal of cell biology*, 142(2), 421-34.
- Ho, C., Van Etten, J., & Shuman, S. (1996). Expression and characterization of an RNA capping enzyme encoded by Chlorella virus PBCV-1. *Journal of Virology*, 70(10), 6658-6664.
- Ho, C., Van Etten, J., & Shuman, S. (1997). Characterization of an ATP-dependent DNA ligase encoded by Chlorella virus PBCV-1. *J. Virol.*, 71(3), 1931-1937.
- Hoppins, S. C., & Nargang, F. E. (2004). The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *The Journal of biological chemistry*, 279(13), 12396-405.
- Ishii, T. M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C. T., Adelman, J. P., & Maylie, J. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11651-6.

- Johnson, A. E., & van Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annual review of cell and developmental biology*, 15, 799-842.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39(3 Pt 2), 499-509.
- Kang, M., Moroni, A., Gazzarrini, S., & Van Etten, J. L. (2003). Are chlorella viruses a rich source of ion channel genes? *FEBS letters*, 552(1), 2-6.
- Karniely, S., & Pines, O. (2005). Single translation--dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO reports*, 6(5), 420-5.
- Karsten, V., Hegde, R. S., Sinai, A. P., Yang, M., & Joiner, K. A. (2004). Transmembrane domain modulates sorting of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry*, 279(25), 26052-7.
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., & Goldstein, S. A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, 376(6542), 690-5.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, 362(6416), 127-33.
- Lavrukhin, O. V., Fortune, J. M., Wood, T. G., Burbank, D. E., Van Etten, J. L., Osheroff, N., u. a. (2000). Topoisomerase II from Chlorella virus PBCV-1. Characterization of the smallest known type II topoisomerase. *The Journal of biological chemistry*, 275(10), 6915-21.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., u. a. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *The EMBO journal*, 15(5), 1004-11.
- Lithgow, T. (2000). Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS letters*, 476(1-2), 22-6.
- Luirink, J., & Dobberstein, B. (1994). Mammalian and Escherichia coli signal recognition particles. *Molecular microbiology*, 11(1), 9-13.
- Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E., & de Gier, J. (2005). Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y. F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y. N., u. a. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5502), 316-9.
- Maggio, C., Barbante, A., Ferro, F., Frigerio, L., & Pedrazzini, E. (2007). Intracellular sorting of the tail-anchored protein cytochrome b5 in plants: a comparative study using different isoforms from rabbit and Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, 58(6), 1365-1379.
- Manzur, K. L., Farooq, A., Zeng, L., Plotnikova, O., Koch, A. W., Sachchidanand, u. a. (2003). A dimeric viral SET domain methyltransferase specific to Lys27 of histone H3. *Nature structural biology*, 10(3), 187-96.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., & Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO reports*, 3(2), 159-64.

- Mehmel, M., Rothermel, M., Meckel, T., Van Etten, J. L., Moroni, A., & Thiel, G. (2003). Possible function for virus encoded K⁺ channel Kcv in the replication of chlorella virus PBCV-1. *FEBS letters*, 552(1), 7-11.
- Mehnert, T., Lam, Y. H., Judge, P. J., Routh, A., Fischer, D., Watts, A., u. a. (2007). Towards a mechanism of function of the viral ion channel Vpu from HIV-1. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 24(6), 589-96.
- Meier, S., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2005). Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *The Journal of cell biology*, 170(6), 881-8.
- Melén, K., Krogh, A., & von Heijne, G. (2003). Reliability measures for membrane protein topology prediction algorithms. *Journal of molecular biology*, 327(3), 735-44.
- Mihara, K., & Omura, T. (1996). Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp 70. *Trends in cell biology*, 6(3), 104-8.
- Mikosch, M., Hurst, A. C., Hertel, B., & Homann, U. (2006). Diacidic Motif Is Required for Efficient Transport of the K⁺ Channel KAT1 to the Plasma Membrane. *Plant Physiology*, 142(3), 923-930.
- Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome biology*, 1(4), REVIEWS0004.
- Miyazaki, E., Kida, Y., Mihara, K., & Sakaguchi, M. (2005). Switching the sorting mode of membrane proteins from cotranslational endoplasmic reticulum targeting to posttranslational mitochondrial import. *Molecular biology of the cell*, 16(4), 1788-99.
- Mokranjac, D., & Neupert, W. (2005). Protein import into mitochondria. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 5), 1019-23.
- Montal, M. (2003). Structure-function correlates of Vpu, a membrane protein of HIV-1. *FEBS letters*, 552(1), 47-53.
- Moroni, A., Viscomi, C., Sangiorgio, V., Pagliuca, C., Meckel, T., Horvath, F., u. a. (2002). The short N-terminus is required for functional expression of the virus-encoded miniature K(+) channel Kcv. *FEBS letters*, 530(1-3), 65-9.
- Munro, S., & Pelham, H. R. B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48(5), 899-907.
- Nakai, K., & Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 34-35.
- Nanjo, Y., Oka, H., Ikarashi, N., Kaneko, K., Kitajima, A., Mitsui, T., u. a. (2006). Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *The Plant cell*, 18(10), 2582-92.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 66, 863-917.

- Neupert, W., & Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(8), 555-65.
- Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 76, 723-49.
- Ng, D., Brown, J., & Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology*, 134(2), 269-278.
- Nishimura, N., & Balch, W. E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5325), 556-8.
- Ott, C. M., & Lingappa, V. R. (2004). Signal sequences influence membrane integration of the prion protein. *Biochemistry*, 43(38), 11973-82.
- Paschen, S. A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., u. a. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, 426(6968), 862-6.
- Pedrazzini, E., Villa, A., & Borgese, N. (1996). A mutant cytochrome b5 with a lengthened membrane anchor escapes from the endoplasmic reticulum and reaches the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 4207-12.
- Peeters, N., & Small, I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et biophysica acta*, 1541(1-2), 54-63.
- Pelkmans, L., & Helenius, A. (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Current opinion in cell biology*, 15(4), 414-22.
- Petrova, V. Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V., & Schmitt, M. J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *The Biochemical journal*, 380(Pt 2), 393-400.
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J., & Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 69(3), 517-528.
- Plugge, B., Gazzarrini, S., Nelson, M., Cerana, R., Van Etten, J. L., Derst, C., u. a. (2000). A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5458), 1641-4.
- Radhamony, R. N., & Theg, S. M. (2006). Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. *Trends in cell biology*, 16(8), 385-7.
- Rapoport, T. (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, 258(5084), 931-936.
- Rassow, J., Maarse, A. C., Krainer, E., Kübrich, M., Müller, H., Meijer, M., u. a. (1994). Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *The Journal of cell biology*, 127(6 Pt 1), 1547-56.
- Rayner, J. C., & Pelham, H. R. (1997). Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *The EMBO journal*, 16(8), 1832-41.

- Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., & Truscott, K. N. (2001). The mitochondrial import machinery for preproteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 36(3), 291-336.
- Rehm, A., Stern, P., Ploegh, H. L., & Tortorella, D. (2001). Signal peptide cleavage of a type I membrane protein, HCMV US11, is dependent on its membrane anchor. *The EMBO journal*, 20(7), 1573-82.
- Robin, M., Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Sepuri, N. B. V., Gordon, D. M., Pain, D., u. a. (2002). Bimodal Targeting of Microsomal CYP2E1 to Mitochondria through Activation of an N-terminal Chimeric Signal by cAMP-mediated Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 40583-40593.
- Robin, M., Anandatheerthavarada, H. K., Fang, J., Cudic, M., Otvos, L., & Avadhani, N. G. (2001). Mitochondrial Targeted Cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) Contains an Intact N Terminus and Requires Mitochondrial Specific Electron Transfer Proteins for Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24680-24689.
- Rojo, E. E., Stuart, R. A., & Neupert, W. (1995). Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP. *The EMBO journal*, 14(14), 3445-51.
- Rudhe, C., Clifton, R., Chew, O., Zemam, K., Richter, S., Lamppa, G., u. a. (2004). Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *Journal of molecular biology*, 343(3), 639-47.
- Rutkowski, D. T., Ott, C. M., Polansky, J. R., & Lingappa, V. R. (2003). Signal sequences initiate the pathway of maturation in the endoplasmic reticulum lumen. *The Journal of biological chemistry*, 278(32), 30365-72.
- Schneider, H., Arretz, M., Wachter, E., & Neupert, W. (1990). Matrix processing peptidase of mitochondria. Structure-function relationships. *The Journal of biological chemistry*, 265(17), 9881-7.
- Schubert, U., Ferrer-Montiel, A. V., Oblatt-Montal, M., Henklein, P., Strebel, K., & Montal, M. (1996). Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Letters*, 398(1), 12-18.
- Schwarz, E., & Neupert, W. (1994). Mitochondrial protein import: mechanisms, components and energetics. *Biochimica et biophysica acta*, 1187(2), 270-4.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J., Gaymard, F., u. a. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*, 256(5057), 663-665.
- Sevier, C. S., Weisz, O. A., Davis, M., & Machamer, C. E. (2000). Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs. *Molecular biology of the cell*, 11(1), 13-22.
- Shih, T. M., & Goldin, A. L. (1997). Topology of the Shaker potassium channel probed with hydrophilic epitope insertions. *The Journal of cell biology*, 136(5), 1037-45.

- Silva-Filho, M. C. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Current opinion in plant biology*, 6(6), 589-95.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., & Mireau, H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Molecular Biology*, 38(1), 265-277.
- Soll, J., & Schleiff, E. (2004). Protein import into chloroplasts. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(3), 198-208.
- Söllner, T. H. (2004). Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Current opinion in cell biology*, 16(4), 429-35.
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6, 175-82.
- Sriskanda, V., & Shuman, S. (2002). Role of nucleotidyltransferase motifs I, III and IV in the catalysis of phosphodiester bond formation by Chlorella virus DNA ligase. *Nucleic Acids Research*, 30(4), 903-911.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Künkele, K. P., Nussberger, S., Neupert, W., u. a. (2000). Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *The EMBO journal*, 19(18), 4895-902.
- Stefanovic, S., & Hegde, R. S. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell*, 128(6), 1147-59.
- Strandberg, E., & Killian, J. A. (2003). Snorkeling of lysine side chains in transmembrane helices: how easy can it get? *FEBS letters*, 544(1-3), 69-73.
- Truscott, K. N., & Pfanner, N. (1999). Import of carrier proteins into mitochondria. *Biological chemistry*, 380(10), 1151-6.
- Truscott, K. N., Brandner, K., & Pfanner, N. (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Current biology : CB*, 13(8), R326-37.
- Van Etten, J. L., Graves, M. V., Müller, D. G., Boland, W., & Delaroque, N. (2002). Phycodnaviridae--large DNA algal viruses. *Archives of virology*, 147(8), 1479-516.
- Villarejo, A., Burén, S., Larsson, S., Déjardin, A., Monné, M., Rudhe, C., u. a. (2005). Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nature cell biology*, 7(12), 1224-31.
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO journal*, 5(6), 1335-42.
- Vongsamphanh, R., Fortier, P. K., & Ramotar, D. (2001). Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Molecular and cellular biology*, 21(5), 1647-55.

- Waltner, M., & Weiner, H. (1995). Conversion of a nonprocessed mitochondrial precursor protein into one that is processed by the mitochondrial processing peptidase. *The Journal of biological chemistry*, 270(44), 26311-7.
- Weber, W. M. (1999). Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments. *The Journal of membrane biology*, 170(1), 1-12.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., & Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 279(15), 14473-6.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfish, B., Rospert, S., Ryan, M. T., u. a. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, 424(6948), 565-71.
- Yamada, H., Chounan, R., Higashi, Y., Kurihara, N., & Kido, H. (2004). Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Letters*, 578(3), 331-336.
- Young, J. C., Moarefi, I., & Hartl, F. U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of cell biology*, 154(2), 267-73.
- Young, J. C., Hoogenraad, N. J., & Hartl, F. U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, 112(1), 41-50.
- Yuan, C., O'Connell, R. J., Feinberg-Zadek, P. L., Johnston, L. J., & Treistman, S. N. (2004). Bilayer Thickness Modulates the Conductance of the BK Channel in Model Membranes. *Biophys. J.*, 86(6), 3620-3633.

Anhang

A Abkürzungen

A	Adenin
AS	Aminosäure/n
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Carboxy
C	Cytosin
CHO-K1	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CLSM	<i>confocale laser scanning microscopy</i>
DNA	<i>desoxyribonukleinacid</i>
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EsV-1	<i>Ectocarpus siliculosus Virus 1</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequoria victoria</i>
HA	Hämaglutinin
HEK293	Human embryonic kidney cells 293
Hsp	<i>heat shock protein</i>
kbp	Kilobasenpaare
Kcv	Kaliumkanal aus dem <i>Paramecium bursaria Virus</i>
kDa	Kilodalton
Kesv	Kaliumkanal aus dem <i>Ectocarpus siliculosus Virus</i>
M	Mol pro Liter
min	Minute
n	Anzahl der Versuchswiederholungen
ORF	<i>open reading frame</i>
PBCV-1	<i>Paramecium bursaria Chlorella Virus 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
SRP	Signalerkennungspartikel
T	Tymin
TA	<i>tail anchored</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TM1	Transmembrandomäne 1
TM2	Transmembrandomäne 2
TMHMM	<i>transmembrane prediction using Hidden Markov models</i>
Tris	Tri(hydroxymethyl)methylamin
TIC	<i>translocase of inner chloroplast membrane</i>
TIM	<i>translocase of inner mitochondrial membrane</i>
TOC	<i>translocase of outer chloroplast membrane</i>
TOM	<i>translocase of the outer mitochondrial membrane</i>
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
wt	Wildtyp

B Aminosäuren, Ein- und Dreibuchstabencode

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin	X		unbestimmt

C Konstrukte

pEGFP:

Kcv-wt

Kesv-wt

Kesv_R3E

Kesv_R3E+R4E

Kesv_R16E

Kesv_R16S

Kesv_K25E

Kesv_R3E+R4E+R16E

Kesv_R3E+R4E+R16S

Kesv_R3E+R4E+R16E+K25E

Kesv_P97T+K98G

Kesv_L102C

Kesv_A109T

Kesv_P116T

Kesv_L102C+P116T

Kesv_P97T+K98G+L102C+P116T

Kesv_P97T+K98G+L102C+A109T+P116T

Kesv 108IVL

Kesv 110IVL

Kesv_113IVL

Kesv_113VVV

Kesv_113VV

Kesv_113V

Kesv_115IVL

Chimäre N-Terminus (Kcv)	Kcv (M1-E12) plus Kesv (S37-K124)
Chimäre N-Terminus (Kesv)	Kesv (M1-T36) plus Kcv (P13-L94)
Chimäre TM2 (Kcv)	Kesv (M1-D91) plus Kcv (I69-L94)
Chimäre TM2 (Kesv)	Kcv (M1-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre TM1 3/3 Kcv	Kesv (M1-T36) plus Kcv (P13-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre TM1 1/3 Kesv	Kesv (M1-L43) plus Kcv (I20-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre TM1 2/3 Kesv	Kesv (M1-V51) plus Kcv (Y28-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre TM1 3/3 Kesv	Kesv (M1-L59) plus Kcv (E36-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre (Kcv)/Pore(Kesv)	Kcv (M1-F35) plus Kesv (D60-L92) plus Kcv (T74-L94)
Kesv-wt FCYENE	ER-Export-Motive FCYENE eingefügt im Linker zwischen Kesv und GFP
Kesv::GFP_KDEL	KDEL nach GFP
pcDNA3:	
Kcv-wt	
Kesv-wt	
Kcv_HA	Kcv mit C-terminalem HA-tag
Kcv_HA_3G	Kcv mit C-terminalem HA-tag und 3 eingefügten Glycinen als Spacer
Kesv_HA	Kesv mit C-terminalem HA-tag
Kcv_Linker_HA	Kcv mit Linker aus pEGFP und angefügtem HA-tag
Kesv_Linker_HA	Kesv mit Linker aus pEGFP und angefügtem HA-tag
pYES2:	
Kcv-wt	
Kesv-wt	
Kesv_113VVV	
Kesv_113VV	
Kesv_113VM	
Kesv_113V	
Chimäre N-Terminus (Kcv)	Kcv (M1-E12) plus Kesv (S37-K124)
Chimäre N-Terminus (Kesv)	Kesv (M1-T36) plus Kcv (P13-L94)
Chimäre TM2 (Kcv)	Kesv (M1-D91) plus Kcv (I69-L94)
Chimäre TM2 (Kesv)	Kcv (M1-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre TM1 3/3 Kcv	Kesv (M1-T36) plus Kcv (P13-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre TM1 1/3 Kesv	Kesv (M1-L43) plus Kcv (I20-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre TM1 2/3 Kesv	Kesv (M1-V51) plus Kcv (Y28-D68) plus Kesv (L92-K124)
Chimäre TM1 3/3 Kesv	Kesv (M1-L59) plus Kcv (E36-D68) plus Kesv (L92-K124)

D Primer

Primer für *site directed mutagenesis*:

Name	Sequenz	Zweck
Kesv_R3E_for	5'_CAGATCTATGTCCGAGCGACTGTTTGCG_3'	
Kesv_R3E_rev	5'_CGCAAACAGTCGCTCGGACATAGATCTG_3'	
Kesv_R3E_R4E_for	5'_CAGATCTATGTCCGAGGAACTGTTTGCGACTTGC_3'	
Kesv_R3E_R4E_rev	5'_GCAAGTCGCAAACAGTTCCTCGGACATAGATCTG_3'	
Kesv_R16E_for	5'_GCTATCGCGCTCGAGGGACTGGTGGTG_3'	
Kesv_R16E_rev	5'_CACCACCAGTCCCTCGAGCGCGATAGC_3'	
Kesv_R16S_for	5'_GCTATCGCGCTCAGTGGACTGGTGGTG_3'	
Kesv_R16S_rev	5'_CACCACCAGTCCACTGAGCGCGATAGC_3'	
Kesv_K25E_for	5'_CGGGGGCGTAGAAGAGATTGTATCG_3'	
Kesv_K25E_rev	5'_CGATACAATCTCTTCTACGCCCCCG_3'	
Kev_K98G_for	5'_CGAAAACCTCCGGGTGCAAATTGCTTACC_3'	
Kev_K98G_rev	5'_GGTAAGCAATTTTGACCCGAGTTTTTCG_3'	
Kev_PK97+98TG_for	5'_GCCGAAAACCTACTGGGGCAAATTGCTTACC_3'	
Kev_PK97+98TG_rev	5'_GGTAAGCAATTTTGCCCCAGTAGTTTTTCGGC_3'	
Kev_L102C_for	5'_GGCAAATTGTGTACCATCGCACAC_3'	
Kev_L102C_rev	5'_GTGTGCGATGGTACACAATTTTGCC_3'	
Kesv_108IVL_for	5'_CCATCGCACACATTATCGTTCTATTGGCCATGTTCTTC_3'	
Kesv_108IVL_rev	5'_GAAGAACATGGCCAATAGAACGATAATGTGTGCGATGG_3'	
Kesv_A109T_for	5'_GCACACATTTTGACCATGTTCTTCG_3'	
Kesv_A109T_rev	5'_CGAAGAACATGGTCAAAATGTGTGC_3'	
Kesv_110IVL_for	5'_CACACATTTTGGCCATCGTTCTAATGTTCTTCGTGATG_3'	
Kesv_110IVL_rev	5'_CATCACGAAGAACATTAGAACGATGGCCAAAATGTGTG_3'	
Kesv_113V_for	5'_GCCATGTTCTTCGTAGTGATGCTCCCC_3'	
Kesv_113V_rev	5'_GGGGAGCATCACTACGAAGAACATGGC_3'	
Kesv_113VV_for	5'_GCCATGTTCTTCGTAGTGGTGATGCTCCCC_3'	
Kesv_113VV_rev	5'_GGGGAGCATCACCACTACGAAGAACATGGC_3'	
Kesv_113VVV_for	5'_GCCATGTTCTTCGTAGTGGTAGTGATGCTCCCC_3'	
Kesv_113VVV_rev	5'_GGGGAGCATCACTACCACTACGAAGAACATGGC_3'	
Kesv_115IVL_for	5'_GTTCTTCGTGATGATCGTTCTACTCCCCGTTGTGCG_3'	
Kesv_115IVL_rev	5'_GCGACAACGGGGAGTAGAACGATCATCAGAAGAAC_3'	
Kev_P116T_for	5'_CGTGATGCTCACCGTTGTGCGC_3'	
Kev_P116T_rev	5'_CGCGACAACGGTGAGCATCAGC_3'	
XhoI_silent_mut_for	5'_GCGAAGGCTCTAGAGAAGGAATTC_3'	Entfernung der XhoI- Schnittstelle in Kesv
XhoI_silent_mut_rev	5'_GAATTCCTTCTCTAGAGCCTTCGC_3'	

Sonstige Primer:

BamHI_Kesv_for	5'_GAACTTGGATCCATGTCCCGGCGAC_3'	Primer zur Amplifikation von Kesv mit BamHI-Schnittstelle (N-terminal)
pcDNA3_Kcv+ Kesv_for	5'_GGAGACCCAAGCTTG_3'	Primer zur Amplifikation von Kcv und Kesv aus pcDNA3 mit BamHI-Schnittstelle

Kcv_HA_rev	5'_GTCATGCAACTCGAGCTAAGCGTAA TCAGGCACGTCGTAAGGGTATAAAGTT AGAACGATGAAG_3'	Anfügen von C-terminalem HA-Tag an Kcv mit XhoI-Schnittstelle
Kesv_HA_rev	5'_GTCATGCAATCTAGACTAAGCGTAAT CAGGCACGTCGTAAGGGTACTTCTCGA GAGCCTTCGCGAC_3'	Anfügen von C-terminalem HA-Tag an Kesv mit XbaI-Schnittstelle
Kcv-HA_3G_for	5'_CGTTCTAACTTTAGGAGGAGGTTACC CTTACGAC_3'	Einfügen von 3 Glycinen als Spacer zwischen Kcv und HA-Tag
Kcv-HA_3G_rev	5'_GTCGTAAGGGTAACCTCCTCCTAAA GTTAGAACG_3'	Einfügen von 3 Glycinen als Spacer zwischen Kcv und HA-Tag
	5'_CATGCAACTCGAGCTAAGCGTAATC AGGCACGTCGTAAGGGTAGGTAGCGAC CGG CCGGTGGATC_3'	Anfügen von C-terminalem HA-Tag an Kcv und Kesv inklusive Linker aus den jeweiligen pEGFP- Konstrukten
Chim Primer A	5'_GCGTGTACGGTGGGAGG_3'	Forward Primer zur Amplifikation des N-Terminus von Kcv
Chim Primer B	5'_CCGCCGACGAGaGATTCAGTTCGCG TTAG_3'	Reverse Primer zur Amplifikation des N-Terminus von Kcv (M1-E12) mit homologem Stück von Kesv (ab S37)
Chim Primer C	5'_TCGCTCGTCGGtGGAATATTGTC_3'	Forward Primer zur Amplifikation von Kesv (S37-K124)
Chim Primer D/H	5'_CCGTCGACTGCAGAATTC_3'	Reverse Primer zur Amplifikation von Kcv und Kesv (bindet im pEGFP Linker)
Chim Primer E	5'_CCGGA CTCAGATCT ATG_3'	Forward Primer zur Amplifikation des N-Terminus von Kesv (M1-T36)
Chim Primer F	5'_ GATGTATCATGAATGGAGTATCAATCAG TGG_3'	Reverse Primer zur Amplifikation des N-Terminus von Kesv (M1-T36) mit homologem Stück von Kcv (ab P13)
Chim Primer G	5'_CCATTCATGATACATC_3'	Forward Primer zur Amplifikation von Kesv (P13-L94)
Chim Primer I	5'_GTTTTaGGCAACAAATCTCCGAATCC GAC_3'	Reverse Primer zur Amplifikation von Kcv (M1-G67) mit homologem Stück Kesv (ab D91)
Chim Primer J	5'_TTGTTGCCGAAA ACTCC _3'	Forward Primer zur Amplifikation von Kesv (D91-K124)
Chim Primer K	5'_CGTCTTTGGtAGTATATCGCCGTATC CGAC_3'	Reverse Primer zur Amplifikation von Kesv (M1-G90) mit homologem Stück Kcv (ab D68)
Chim Primer L	5'_ATACTGCCAAAGACGACC_3'	Forward Primer zur Amplifikation von Kcv (D68-L94)
Chim Primer M	5'_GAACATTGCGAGAATCAATATTCctC CGAC_3'	Reverse Primer zur Amplifikation von Kesv (M1-L43) mit homologem Stück Kcv (ab L20)
Chim Primer N	5'_ATTCTCGCAATGTTCG_3'	Forward Primer zur Amplifikation von Kcv (ab L20)
Chim Primer O	5'_GGGAAGAATTTATAACGACGAGCA AAATC_3'	Reverse Primer zur Amplifikation von Kesv (M1-V53) mit homologem Stück Kcv (ab Y28)
Chim Primer P	5'_TATAAATTCTTCCCG_3'	Forward Primer zur Amplifikation von

Chim Primer Q	5'_CAGAGAAGTTATTTCCAGCTGCCAA TAAAG_3'	Kcv (ab Y28) Reverse Primer zur Amplifikation von Kcv (M1-L59) mit homologem Stück Kcv (ab E36)
Chim Primer R	5'_GAAAATAACTTCTCTG_3'	Forward Primer zur Amplifikation von Kcv (ab E36)

Primer für die Sequenzierung:

Seq_pEGFP	5'_CCGGTGAACAGCTCCTCGCCCT TGCTCACC_3'	Sequenzierungsprimer für pEGFP
Seq_pYES_Met25	5'_CTTCGTGTAATACAGGGT_3'	Sequenzierungsprimer für pYES2

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikation eingegangen:

Balss J., Mehmel M., Baumeister D., Hertel B., Delaroque N., Chatelain F., Minor D., Van Etten J. L., Moroni A. & Thiel G. (2007) Transmembrane domain length of viral K⁺ channels is a signal for mitochondria targeting. Bei *Cell* eingereicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Darmstadt, den 14.11.2007

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jörg Balß
Geburtsdatum	15.11.1976
Geburtsort	Darmstadt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Studium

seit 10/2004	Promotionsstudium am Botanische Institut der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thiel im Rahmen des Graduiertenkolleg 340 „Kommunikation in biologischen Systemen“
12/2003 – 08/2004	Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thiel mit dem Thema: „Zelluläre Lokalisation von Mutanten des viralen Kaliumkanals Kcv“ Abschluss: Diplom
10/1997 - 08/2004	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt

Wehrdienst

09/1996 – 06/1997	Fernmeldeeinheit in Koblenz
-------------------	-----------------------------

Schulbildung

08/1987 – 07/1996	Gymnasium, Altes Kurfürstliches Gymnasium Bensheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
08/1983 - 06/1987	Grundschule, Modautalschule Ernsthofen